

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**EXPRESSÃO DOS microRNAs miR15, miR-29, miR-219 e
miR-222 EM RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA
CEREBRAL FOCAL ASSOCIADA AO EXERCÍCIO FÍSICO.**

Aluno: Mucio Luiz de Assis Cirino

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli

Ribeirão Preto

2018

MUCIO LUIZ DE ASSIS CIRINO

**EXPRESSÃO DOS microRNAs miR15, miR-29, miR-219 e
miR-222 EM RATOS SUBMETIDOS A ISQUEMIA
CEREBRAL FOCAL ASSOCIADA AO EXERCÍCIO FÍSICO.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas,
programa Clínica Cirúrgica – opção Morfologia e
Medicina Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

de Assis Cirino, Mucio Luiz

Expressão dos microRNAs miR-15, miR-29, miR-219 e miR-222 em ratos submetidos a isquemia cerebral focal associada ao exercício físico.

89 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli.

1. Isquemia cerebral;
2. Exercício Físico;
3. microRNAs;
4. Neurotransmissores.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mucio Luiz de Assis Cirino

"Expressão dos microRNAs miR-15, miR-29, miR-219 e miR-222 em ratos submetidos a isquemia cerebral focal associada ao exercício físico "

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica – opção: Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Afinal, há é que ter paciência, dar tempo ao tempo, já deveríamos ter aprendido, e de uma vez para sempre, que o destino tem de fazer muitos rodeios para chegar a qualquer parte.

José Saramago

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha amada mãe, cujo amor incondicional me deu forças através de meus dias, me guiando e apoiando a cada passo, por todos os dias de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, que sempre foi minha melhor amiga, minha maior inspiração, meu apoio em todos os momentos difíceis, e meu porto seguro nos momentos mais felizes. Através de seu amor incondicional, me ensinou tudo o que sei, e me transformou em quem eu jamais seria sem o seu exemplo. As palavras jamais serão capazes de traduzir a gratidão que sinto pelo privilégio de ter tido a chance de vir a esse mundo guiado pelas mãos mais amorosas e sensíveis como eu tive. Amo-te e amarei para todo o sempre, com as forças mais íntimas e profundas do meu ser, por toda minha existência.

Agradeço a minha orientadora Professora Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, pela oportunidade extraordinária de retornar a vida acadêmica, sobretudo agradeço pela humildade com que ela gentilmente se dispôs a sair de um patamar tão elevado pra caminhar comigo cada passo deste caminho tão novo e desafiador ao meu lado, me guiando e ensinando com paciência e carinho, aquilo que ela já domina com tanta maestria. Costumo dizer que inúmeras pessoas têm o poder de mudar as vidas ao seu redor para melhor, mas poucas têm a grandeza imensurável para fazê-lo, e esta é sem dúvida a característica mais admirável dela.

Agradeço ainda, e muito mais, a minha parceira e amada amiga Dani, que antes de professora, foi e é minha companheira, me ensinando e me engrandecendo muito mais fora dos muros acadêmicos, através de sua determinação, entrega e todo seu amor e carinho para comigo. Exercendo seu papel mais importante em nossas relações, o da amizade verdadeira e pura, eu não teria a capacidade de agradecer o presente que a vida me deu trazendo a sua amizade para mim. Conhecer-te e ter o prazer de vivenciar sua amizade foi um divisor de águas em minha caminhada. Amo-te e admiro sempre.

Agradeço a meu amigo e companheiro de vida, Fran, por tudo o que você representa em minha vida, por escolher apesar de tudo continuar caminhando comigo, me apoiando sempre que necessário, regozijando-se sempre com minhas conquistas, me fazendo uma pessoa melhor através de seu exemplo, de sua companhia e seu amor. Amo você com todo meu coração.

Agradeço a minhas amigas de vida, Tatiana e Juliana, por todo amor dividido durante uma vida, por tantos momentos eternizados em meu coração, vocês são essências em minha vida.

Agradeço a minha segunda mãe, Pretinha, por todo carinho e dedicação que sempre teve comigo, nunca me diferenciando de seus próprios filhos, me recebendo em sua vida com tanto amor.

Agradeço ao Professor Dr. Luis Fernando Tirapelli, pela grande ajuda e ensinamentos, e pela honra de dividir comigo todo seu grande conhecimento, sempre com tanto carinho e dedicação.

Agradeço a toda minha família, meus pais (ambos) e irmãos (todos eles). Por serem sempre apoio e forças em minha caminhada.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde cada pessoa direta ou indiretamente me ensinou algo, me apoiou e ajudou a crescer nesta caminhada acadêmica. Gostaria em especial agradecer aos colegas Fermino e Lucas, pelo apoio e ajuda direta cuja qual este trabalho não seria possível de se concretizar.

Agradeço por fim a Deus, pela vida extraordinária, cheia de amor e carinho, e espero sempre conseguir com minhas atitudes ser merecedor de tantas bênçãos.

RESUMO

RESUMO

DE ASSIS CIRINO, M. L. **Expressão dos microRNAs miR-15, miR-29, miR-219 e miR-222 em ratos submetidos a isquemia cerebral focal associada ao exercício físico.** 2018. 89f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

INTRODUÇÃO: A isquemia cerebral é uma das principais causas de morte no Brasil, segundo levantamento da Sociedade Brasileira de Neurologia em 2000, sendo a terceira causa de morte após doenças cardiovasculares e o câncer, além de ser uma das maiores causas de seqüela permanente capaz de gerar incapacidade. Nas últimas décadas, estudos experimentais tem demonstrado efeitos benéficos do exercício físico associado à isquemia cerebral. Vários mecanismos moleculares estão envolvidos na fisiopatologia da isquemia cerebral, entre eles as alterações nos perfis de expressão de neurotransmissores. Pesquisas atuais também destacam o papel dos microRNAs na isquemia cerebral quanto na regulação dos neurotransmissores. Portanto, analisar a expressão de neurotransmissores e microRNAs associados à isquemia cerebral, assim como o papel dos benefícios promovidos pelo exercício físico poderá contribuir na elucidação de possíveis vias moleculares com efeito neuroprotetor. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram utilizados 48 animais divididos em quatro grupos experimentais: controle, submetido à isquemia cerebral, submetido ao exercício físico e submetido ao exercício físico associado à isquemia cerebral. A metodologia de PCR em tempo real foi utilizada para analisar a expressão dos miRNAs; miR15b, miR-29b, miR-219 e miR-222. **RESULTADOS E CONCLUSÃO:** não observamos diferenças estatísticas significativas na expressão dos miRNAs miR-15b, miR-

29b, miR-219 e miR-222 no tecido cerebral dos grupos submetidos à isquemia cerebral, submetidos ao exercício físico e na associação dos dois grupos quando comparados ao grupo controle. Entretanto, os miRNAs miR-15b e miR-222 apresentaram maior expressão no grupo com a associação da isquemia cerebral e exercício físico.

Palavras-chave: isquemia cerebral; exercício físico; microRNAs; neurotransmissores.

ABSTRACT

ABSTRACT

DE ASSIS CIRINO, M. L. **Expression of miR-15, miR-29, miR-219 and miR-222 microRNAs in rats submitted to physical exercise associated to focal cerebral ischemia.** 2018. 89f. Dissertation (Master degree) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

INTRODUCTION: Cerebral ischemia is one of the main causes of death in Brazil, according to a survey by the Brazilian Society of Neurology in 2000, being the third cause of death after cardiovascular diseases and cancer, besides being one of the major causes of permanent sequela capable of generate disability. In the last decades, experimental studies have shown beneficial effects of physical exercise associated with cerebral ischemia. Several molecular mechanisms are involved in the pathophysiology of cerebral ischemia, including changes in neurotransmitter expression profiles. Current research also highlights the role of microRNAs both in the process of cerebral ischemia and in the regulation of neurotransmitters. Therefore, analyzing the expression of neurotransmitters and microRNAs associated with cerebral ischemia, as well as the role of the benefits promoted by physical exercise may contribute to the elucidation of possible molecular pathways with neuroprotective effect. MATERIALS AND METHODS: 48 animals were divided into 4 experimental groups: control, cerebral ischemia, physical exercise and physical exercise associated with cerebral ischemia. The real-time PCR methodology was used to analyze miRNA expression: miR15b, miR-29b, miR-219 and miR-222. RESULTS AND CONCLUSION: We did not observe statistically significant differences in the miRNA expression of miRNAs: miR 15b, miR-29b, miR-219 and miR-222 in brain tissue groups submitted to

cerebral ischemia, physical exercise and in the association of the two groups when compared to the group control. However, the miR-15b and miR-222 levels of expression increased in the group of cerebral ischemia associated with physical exercise.

Keywords : Brain ischemia; physical exercise; microRNAs; neurotransmitter.

LISTA DE FIGURAS



LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Biogênese dos microRNAs.....	39
Figura 02	Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da ACME.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do microRNA-15b nos grupos estudados.....	60
Gráfico 2	Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do microRNA-29b nos grupos estudados.....	61
Gráfico 3	Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do microRNA-219 nos grupos estudados.....	62
Gráfico 4	Representação da média (\pm desvio padrão) da expressão do microRNA-222 nos grupos estudados.....	63

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE SIGLAS

°C	Grau Celsius
cm	centímetro
µl	microlitro
ml	mililitro
min	minuto
ng	nanograma
cDNA	DNA complementar
CT	Cycle Threshold
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP's	Desoxirribonucleosídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GABA	Ácido gama-aminobutírico
miRNA	MicroRNA
NT	Neurotransmissores
NMDA	N-metil-D-aspártico
PBS	Salina fosfatada tamponada

PCR	Reação em cadeia da polimerase
RISC	RNA induced silence complex
RNA	Ácido Ribonucléico
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
RQ-PCR	Transcrição reversa quantitativa da PCR
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DA LITERATURA	27
3	HIPÓTESE	44
4	OBJETIVO	46
5	MATERIAS E MÉTODOS	48
5	RESULTADOS	61
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÕES	70
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	73

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Acidente Vascular Cerebral (AVC) é a terceira maior causa de morte no Ocidente e os pacientes acometidos por essa doença apresentam altos índices de invalidez permanente quando comparado a outras enfermidades. A maioria dos AVCs são isquêmicos e causam lesões em uma região específica do cérebro pela restrição de fluxo sanguíneo (DHIRAJ et al, 2013).

Os receptores dos neurotransmissores NMDA e GABA_A controlam muitas funções essenciais do cérebro e alterações em seu perfil de expressão causam muitos distúrbios, como por exemplo disfunções na memória. Entretanto, os eventos moleculares envolvidos nas alterações de expressão dos receptores GABA ainda permanecem desconhecidos, sendo uma das hipóteses que estas alterações são controladas por uma nova classe de reguladores de moléculas de RNA denominados microRNAs. Os microRNAs (miRNAs) estão envolvidos com funções neuronais e vários estudos demonstraram que os miRNAs modulam os receptores dos neurotransmissores NMDA e GABA_A. Muitos miRNAs participam na regulação da sinalização das vias destes receptores de neurotransmissores (MELLIOS et al., 2009; ZHENG et al., 2016).

Durante a isquemia cerebral focal ocorrem alterações temporais no perfil de expressão dos miRNAs em todo o cérebro. Análises de bioinformática demonstraram que os miRNAs regulados na isquemia cerebral tem como alvo genes previamente descritos alterados após AVC em outros trabalhos (DHARAP et al, 2009).

Estudos da literatura atual demonstraram que os miRNAs têm potencial como biomarcadores no soro e plasma, em várias doenças humanas (GORINI; NUNEZ; MAYFIELD, 2013). O diagnóstico da isquemia cerebral é baseado na avaliação clínica e em exames de neuroimagem; entretanto, a identificação de biomarcadores seria essencial para um diagnóstico rápido e conseqüentemente otimizar a estratégia e escolha do tratamento do paciente (DAMBINOVA et al, 2012).

Existem vários estudos epidemiológicos demonstrando que o exercício físico regular é capaz de beneficiar positivamente a saúde, aumentando a qualidade de vida e diminuindo a incidência de disfunção relacionada a qualidade de vida (RADÁK et al.,2006), além de diminuir os riscos e a incidência de AVC (DING et al.,2004).

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Isquemia cerebral Focal e Global

A isquemia cerebral é umas das principais causas de morte no Brasil, segundo levantamento da Sociedade Brasileira de Neurologia em 2000, sendo a terceira causa de morte, atrás apenas das doenças cardiovasculares e do câncer, além de ser uma das maiores causas de sequelas permanentes que geram incapacidade (LOTUFU, 2000).

Alguns estudos demonstraram que a incidência do acidente vascular cerebral (AVC) nos Estados Unidos acomete anualmente entre 500.000 e 750.000 pessoas e principalmente acima de 65 anos (KIM et al., 2010). Existem vários fatores de riscos importantes para a isquemia cerebral, dentre eles estão a hipertensão, o fumo, a inatividade de exercício físico e a obesidade (BRONNER et al. ,1995).

O acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) é uma doença de difícil tratamento, pois pode ocorrer tanto como doença primária quanto secundariamente à doenças sistêmicas (NAKANO et al., 2002). A causa mais comum da isquemia é a oclusão súbita de um vaso sanguíneo, resultando em uma perda quase imediata de oxigênio e glicose no tecido cerebral. A ausência destes leva a vários eventos, tais como excitotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação, provocando assim, lesão neuronal irreversível (JABLONSKA; LUKOMSKA, 2011).

Os cérebros de animais expostos à isquemia cerebral podem mostrar alterações estruturais e bioquímicas em áreas distantes da lesão

isquêmica. Estas alterações podem ser agravadas pelo edema que também pode comprimir células no hemisfério contralateral. Outro mecanismo importante que causa efeitos em áreas distantes da isquemia é o da propagação da depressão cortical, causada por cálcio intracelular que despolariza as células. A depressão cortical se propaga lentamente ao longo das redes neuronais e ativa ou inibe áreas distantes. Ondas de depressão cortical causam estresse metabólico e podem conduzir à indução de vários mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e proteínas de choque térmico em áreas não relacionadas estruturalmente para o próprio infarto (LEKER; SHOHAMI, 2002).

Alguns aspectos importantes devem ser considerados em estudos experimentais quando falamos em isquemia cerebral, tais como: a sua localização como global e focal; o intervalo de tempo considerado, podendo ser permanente ou transitória e neste último caso podendo ocorrer reperfusão pós-isquêmica e, a intensidade da isquemia, podendo ser total ou parcial. Entretanto, combinados os diferentes aspectos considerados, vários modelos experimentais se tornam possíveis (COLLI; SILVA; CARLOTTI JR, 1998).

Durante o processo de isquemia global há privação total de perfusão e/ou oxigenação para o sistema nervoso central. No rato, a isquemia global pode ser induzida por parada cardíaca e por obstrução de duas, três ou das quatro artérias carótidas combinadas à hipotensão (OLSSON; WIELOCH; SMITH, 2003). Existem dois modelos básicos de isquemia cerebral global (ICG), por parada cardíaca e interrupção seletiva da circulação cerebral. A interrupção seletiva da circulação cerebral é a forma mais adequada para

a indução de parada cardíaca, pois o controle do pesquisador é maior e reduz a variabilidade entre os animais (ARRIBAS et al.,2008).

A isquemia cerebral focal, apresenta fluxo sanguíneo amplamente diminuído, sendo vulnerável à morte por necrose dentro de poucos minutos após a isquemia (LEKER; SHOHAMI, 2002). A diminuição do fluxo sanguíneo cerebral leva ao aparecimento de uma zona de isquemia que é dividida em zona central chamada isquêmica e uma zona periférica chamada de penumbra. Após alguns minutos de isquemia haverá morte celular na zona central (SWEENEY et al., 1995). A zona de penumbra é uma região com atividade elétrica esporádica e desorganizada devido a disfunção da bomba de sódio e potássio da membrana e representa uma margem de tecido viável (PULSINELLI, 1992; LEKER ; SHOHAMI, 2002). A zona imediatamente ao redor desta camada de penumbra primária apresenta pouca possibilidade de morrer já que a sua perfusão é relativamente melhor (DHODDA et al., 2004).

2.2. Modelo experimental com isquemia cerebral

Existem uma variedade de espécies animais que são utilizadas para experimentos neurológicos. Algumas delas apresentam características funcionais que especialmente são favoráveis ao estudo pela sua semelhança a anatomia humana. Para a realização destes experimentos são utilizados animais como primatas, camundongos, ratos e outros roedores (COSTA, 2004). O modelo de oclusão focal temporária com ou sem reperfusão é o que simula a situação clínica vivenciada pelo neurocirurgião durante microcirurgias. Este modelo foi introduzido em 1981, sendo as principais técnicas: a coagulação da artéria cerebral média (ACM) após a realização de pequena

craniotomia (TAMURA et al., 1981), a oclusão da ACM associada à ligadura sucessiva das artérias carótidas comuns (CHEN et al., 1986) e a oclusão da ACM por introdução de filamento intraluminal (KOIOSUMI et al., 1986; CARLOTTI JR; COLLI; KAZUO, 2001).

2.3. Isquemia cerebral e métodos de Avaliação

Vários métodos podem ser utilizados para avaliar uma isquemia cerebral experimental, sendo os mais importantes os métodos clínicos, morfológicos e funcionais, como avaliação da simetria motora, pois os animais que sofrem lesão apresentam hemiparesia, movimento circular, ptose palpebral, letargia e rotação vigorosa ao redor do eixo longitudinal. Também podem ser realizadas avaliações histopatológicas e *open field*, observando atividade locomotora e comportamental dos animais (PENASSO,2005).

Os testes clínicos consistem geralmente em um exame simples e rápido, e permitem classificar os animais de modo eficiente (BEDERSON et al., 1986a; MENZIES et al., 1992; WESTERMAYER et al., 2000).

Menzies et al.(1992) classificaram os animais em uma escala de 0 a 4: grau 0 sem déficit motor aparente; grau 1 - flexão contralateral da pata dianteira; grau 2 - diminuição da força de garra da pata dianteira contralateral quando puxado pela cauda; grau 3 - movimentação espontânea em todas as direções, com marcha em círculos quando puxado pela cauda e andar em círculos e, grau 4 – marcha espontaneamente em círculo.

Na área neuropsicobiológica são bastante utilizadas o *open field* em estudos experimentais em ratos (DENENBERG,1969; WALSH; CUMMINS,1976; COIMBRA et al., 1996; COIMBRA et al., 2001)

2.4. Isquemia cerebral e exercício físico

O exercício físico regular é saudável, tendo melhoras na auto-estima e bem estar e está associado à incidência de certas doenças (RADAK et al., 2001). Tem demonstrado também ter uma ação tanto preventiva como terapêutica para várias doenças (WILMORE; COSTIL, 2001).

Estudos demonstraram que o sedentarismo está relacionado com o aumento de risco de AVCs (GILLUM; INGRAM, 1996). Durante as últimas décadas, estudos experimentais têm demonstrado efeitos benéficos do exercício físico na isquemia cerebral, incluindo o aumento de sobrevivência, redução de déficit neurológico e manutenção da integridade neurovascular (STUMMER et al., 1995; ANG et al., 2003; DING et al., 2005).

As duas formas de exercício mais utilizadas em experimentos com ratos são o exercício de natação e a corrida em esteira. Estes dois modelos de exercício possuem protocolos distintos e servem tanto para o estudo do exercício agudo como crônico. Apesar disso, outras formas de exercício também têm sido utilizadas, tais como saltos através de estimulação elétrica (NOTOMI et al., 2000), exercício resistido através de agachamento (BUHL et al., 2001) e a realização de saltos, com o animal submerso em água, suportando uma sobrecarga de 50% da massa corporal (SILVA et al., 1999).

A corrida motorizada tem sido demonstrada como neuroprotetora em vários modelos experimentais de isquemia. Além do aumento da neurogenese no giro denteado de ratos normais, a roda de corrida aumenta a expressão de

proteínas envolvidas no tráfego sináptico e nas vias de transdução de sinais de neurotrofinas e neurotransmissores (PLOUGHMAN et al.,2005).

A utilização da corrida em esteira apresenta algumas vantagens, tais como controle da velocidade e a possibilidade de determinação do VO_{2max} , enquanto que a vantagem da natação é o fato do animal ter uma capacidade inata de nadar. No entanto, existem limitações em ambos os modelos de exercício. Na esteira, alguns animais só exercitam-se quando são estimulados através de choques elétricos, o que pode estressar muito o animal, enquanto na natação, o uso de uma sobrecarga maior do que a capacidade do animal pode levar à fadiga, e conseqüentemente à morte por afogamento, se não for retirado do tanque a tempo.

O controle do ritmo durante a realização do exercício é outro aspecto que deve ser considerado, pois na esteira alguns animais podem deixar de correr descansando no fundo das baias, enquanto na natação, o animal pode submergir, permanecendo em apnéia, e diminuir o ritmo do exercício, podendo até mesmo parar de realizar o exercício, se a profundidade do tanque permitir.

Acredita-se que exercícios moderados aumentam a cognição, sendo recentemente demonstrado que o cérebro é responsivo a atividade física. Isso significa que a atividade física apresenta potencial na prevenção e tratamento de danos traumáticos cerebrais (AGUIAR; PINHO, 2007).

Alguns estudos tem demonstrado que o exercício físico, após 24 horas à isquemia cerebral focal, melhora significativamente a recuperação neurológica e reduz o volume de infarto (YANG et al.,2002).

2.5. Isquemia cerebral e neurotransmissores

Quando o encéfalo é lesado, os neurônios são privados de oxigênio por tempo prolongado; morrem e não se regeneram, sendo que a lesão não fica restrita aos neurônios privados de oxigênio. Estudos recentes demonstraram que esses neurônios, são responsáveis pelo neurônios adjacentes. Os neurônios privados de oxigênio liberam, por suas terminações axônicas, grande quantidade de glutamato, um neurotransmissor excitatório. Concentração excessiva de glutamato pode ser tóxica para os neurônios, levando à morte celular, o que é chamado de excitotoxicidade (EKAM, 2000).

O sistema glutamatérgico é amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC) e está envolvido em funções cognitivas fundamentais tais como memória e aprendizado, sendo o glutamato considerado o maior neurotransmissor excitatório do SNC (BRESSAN; PILOWSKY, 2003). O glutamato é sintetizado através de três precursores (glutamina, glicose e ornitina), é armazenado nos terminais pré-sinápticos em vesículas e em forma livre, que são liberadas na fenda sináptica onde podem ser recaptadas, estimulam receptores pós sinápticos que permitem a entrada de cálcio para o interior das células, em especial os receptores do tipo NMDA (N-metil-Daspartato) (DIAS et al., 2000).

Os receptores glutamatérgicos são classificados em receptores ionotrópicos e receptores metabotrópicos. Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR) agem através de segundo mensageiro e estão presentes em todas as regiões do cérebro. Em condições fisiológicas, a ativação de mGluRs pelo glutamato produz uma corrente pós-sináptica lenta. Os receptores ionotrópicos são canais iônicos que quando ativados permitem a

entrada de ions Na^+ e/ou Ca^{+2} favorecendo a despolarização do neurônio. Eles são divididos em receptores NMDA e receptores não-NMDA, que por sua vez incluem os receptores *alfa-amino-3-hydroxi-5-methyl-4 lisoazole propionic acid* (AMPA) e kainato. Os receptores AMPA e Kainato localizam-se em regiões telencefálicas e fazem a mediação da transmissão rápida nas sinapses excitatórias com duração de somente alguns milissegundos (BRESSAN; PILOWSKY, 2003).

Existe uma participação do glutamato na lesão neuronal isquêmica, estimulando os receptores de canal de cálcio, principalmente os receptores NMDA (BRADFORD; WARD,1978). O acúmulo extracelular de glutamato sob condições isquêmicas, hiperestimula os receptores tipo NMDA, AMPA e Kainato, promovendo influxo de Na^+ e efluxo de K^+ através dos canais de membrana ativados pelos receptores de glutamato. Os canais iônicos receptor-NMDA-regulados são altamente permeáveis ao Ca^{2+} e fazem a mediação do influxo de Ca^{2+} nos neurônios. Com a abertura dos canais (ativados por receptores de glutamato) ocorre o fenômeno da depressão alastrante, que se propaga a partir do centro isquêmico para a área de penumbra. A depressão alastrante aumenta a demanda metabólica e a falência energética, favorecendo ainda mais a liberação de glutamato (GORJI, 2001).

Além da presença de aminoácidos excitatórios, como o glutamato no processo isquêmico, os aminoácidos inibitórios também atuam de maneira a amenizar os danos causados pela excitotoxicidade. Mecanismos gabaérgicos podem mediar alterações na excitabilidade neuronal, de uma maneira semelhante à plasticidade cortical normal, propriedade do sistema nervoso que

permite o desenvolvimento de alterações estruturais em resposta à experiência, e como adaptação a condições mutantes e a estímulos repetidos (HENSCH, 2005).

O GABA é um aminoácido constituído por quatro carbonos e, no cérebro, é formado a partir da descarboxilação do ácido glutâmico pela enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). Neste processo, a GAD utiliza o piridoxalfosfato como cofator e, uma vez que o piridoxalfosfato é derivado da vitamina B6, uma deficiência desta enzima pode levar à diminuição da síntese de GABA (FARIELLO et al. 1991). O mecanismo de remoção do GABA nos receptores pós-sinápticos é semelhante ao do glutamato. Tanto os neurónios como as células da glia possuem transportadores de alta afinidade e após a sua retirada o transformam em succinato, o qual é, em seguida, metabolizado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e transforma-se em ATP. As enzimas necessárias para essa degradação ocorrer são a GABA amino-transferase e a desidrogenase do semi-aldeído succínico, que estão presentes nas mitocôndrias (PURVES, 2005; BRODAL, 2010).

O GABA foi descoberto no tecido cerebral na década de 1950 e hoje é considerado o principal NT inibitório, ocorrendo em cerca de 30 a 50% das sinapses cerebrais. O GABA inibe a atividade neuronal por 3 diferentes mecanismos. O primeiro acontece pela hiperpolarização da membrana pós-sináptica devido à abertura de canais iônicos, principalmente de cloro. O segundo, por uma diminuição da resistência da membrana, permitindo ligação de outros NT que realizarão concorrência com os potenciais excitatórios e; o terceiro mecanismo, ocorre pela inibição pré-sináptica, em que a despolarização excitatória no terminal pré-sináptico leva a um decréscimo na

entrada de cálcio e consequente decréscimo na liberação do NT excitatório (FARIELLO et al. 1991).

Os receptores GABA podem ser de 2 tipos: GABA_A e GABA_B, sendo que os GABA_A são ionotrópicos e os GABA_B são metabotrópicos. Os ionotrópicos GABA_A possuem a característica de serem ativados pelo ácido gama aminobutírico, pelo muscimol, bloqueados pela bicuculina e modulados pelos benzodiazepínicos (MACDONALD & OLSEN, 1994). São comumente inibitórios porque seus canais associados são permeáveis ao cloro, tornando o potencial de inversão mais negativo, ou seja, resultando em hiperpolarização da membrana, ao invés de despolarização como ocorre nas sinapses excitatórias. Os receptores ionotrópicos GABA são constituídos por uma combinação de cinco subunidades, formando um pentâmero. Atualmente existem 16 subunidades identificadas: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), δ , ϵ , θ , π), além de 3 subunidades ρ (1-3), que alguns autores chamam de GABA_C, porém não reconhecidas pela literatura atual que considera estas três unidades também fazendo parte do tipo GABA_A (OLSEN & SIEGHART, 2008). A combinação mais comum dos receptores GABA_A são duas subunidades α 1, duas β 2 e uma γ 2 (BENARROCH, 2007; OLSEN et al., 2007). Como consequência dessa diversidade, a função dos receptores GABA difere amplamente entre os tipos neuronais. Os receptores GABA_B são ativados pelo ácido gama aminobutírico e pelo agonista seletivo baclofen, porém não são sensíveis aos ligantes típicos dos GABA_A como o muscimol e bicuculina. São também amplamente distribuídos pelo sistema nervoso central e possuem ação inibitória pela ação intermediária da proteína G e de outras moléculas de sinalização intracelular, que atuam sobre canais de potássio e cálcio, levando à hiperpolarização das

células pós sinápticas. São compostos por heterodímeros das subunidades GABA_B R1 e GABA_B R2 (YAMADA et al., 1999).

Esses mecanismos mediados pelo GABA (ácido gama-aminobutírico) desempenham papel central na recuperação funcional do córtex peri-infarto após o acidente vascular cerebral. A ação inibitória do neurotransmissor GABA é fundamental para a plasticidade e mapeamento sensorial. A alteração da transmissão gabaérgica muda os mapas sensoriais durante o período crítico do desenvolvimento da área cortical, produzindo alterações rápidas em mapas corticais de adultos semelhantes a mudanças que ocorrem após a isquemia, alterando a formação da memória (DONOGHUE et al., 1990; FOELLER et al., 2005).

2.6. Isquemia Cerebral e microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe recém descoberta de pequenas moléculas de RNA que negativamente regulam a expressão do gene no nível pós-transcricional. A descoberta dessas pequenas moléculas não codificadoras favoreceu nossa compreensão no mecanismo de regulação da expressão gênica (CONTI et al, 2009). Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA contendo de 18-25 nucleotídeos que regulam a estabilidade ou a eficiência de tradução do RNA mensageiro (mRNA) (MENDELL, 2005).

Jeyaseelan, Lim, Arumugam (2008), em estudo com ratos submetidos à isquemia cerebral por oclusão da artéria cerebral média com reperusão de 24 e 48 horas, realizaram uma análise global do perfil de expressão dos microRNAs pela técnica de análise em larga escala de *microarrays*, seguida de

validação dos microRNAs selecionados por PCR em tempo real no sangue dos animais assim como no tecido isquêmico. No sangue dos animais, três grupos de miRNAs foram identificados: o primeiro foi o grupo dos miRNAs diferencialmente expressos apenas no período de 24 horas de reperfusão, sendo que alguns apresentaram-se hiperexpressos e outros hipoexpressos. O segundo grupo compreendeu os miRNAs que alteraram os seus níveis de expressão apenas após 48 horas de reperfusão. Um terceiro grupo foram os miRNAs que apresentaram níveis de expressão diferentes em ambos períodos de reperfusão, sendo que os miRNAs miR-150, miR-195 e miR-320 apresentaram níveis opostos de expressão e os miRNAs miR-103, miR107 e miR-191 apresentaram níveis de hipoexpressão semelhantes nos dois períodos. No tecido isquêmico foram encontrados 56 miRNAs com níveis de expressão alterados em ambos os períodos de reperfusão, assim como 32 miRNAs foram diferencialmente expressos com 24 horas de reperfusão e, ainda, 8 miRNAs exclusivamente no período de 48 horas de reperfusão. Os microRNAs (miRNAs) estão envolvidos com funções neuronais e vários estudos demonstraram que os miRNAs modulam os receptores GABA. Muitos miRNAs participam na regulação da sinalização das vias destes receptores de neurotransmissores (MELLIOS et al., 2008; HE et al. 2011).

O processo de formação e atividade do miRNA inicia-se através da enzima polimerase II que irá gerar a transcrição do miRNA primário (pri-miRNA) após os quais vão ser sequenciados pela Drosha e Dicer (PORKKA et al, 2007). O microRNA primário é processado através de um mecanismo conservador para produzir uma maturação do microRNA (Figura 1). Os microRNAs são processados por um alto regulador a fim de controlar a

quantidade de microRNA ativo nas células. Inicialmente um complexo de proteína nuclear que consiste na Drosha (RNase tipo III) entre outras proteínas, clivam *hairpin* em uma sequência longe do microRNA primário para formar o precursor do mesmo. Esses microRNAs vão ser então exportados para o citoplasma onde são transformados por um complexo de proteínas contendo o tipo III Dicer, a RNase produz o microRNA maduro. Depois de produzir o RNA maduro ele é carregado para o interior da RISC (Indução silenciosa do RNA). Esse microRNA liga-se ao alvo mRNA afim de reduzir a tradução da proteína. A ligação ocorre pelo reconhecimento da sequência complementar do gene alvo UTR'3. A 5' é o final do microRNA, a região do reconhecimento (Figura 1) (LAWLER; CHIOCCA, 2009).

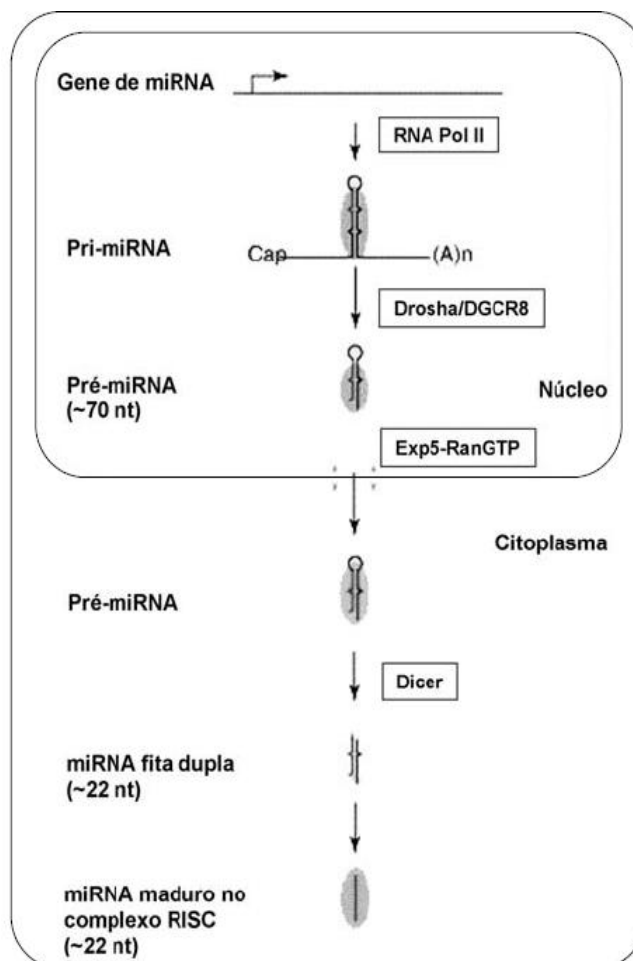


Figura 1. Via da biogênese do microRNA (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006).

Estudos recentes demonstraram, que a evolução de muitas doenças apresentam condições patológicas que podem alterar significativamente os perfis dos microRNAs cerebral (NICOLOSO; CALIN, 2008), sendo que esses microRNAs estão envolvidos nos tumores cerebrais, doença de Alzheimer, síndrome de Down, esquizofrenia (BEVERIDGE et al, 2008) e AVC (JEYASEELAN et al, 2008). Os microRNAs estão em grande quantidade no SNC, onde realizam efeito no desenvolvimento neuronal, mantendo um fenótipo neuronal. Eles também estão expressos nos dendritos, onde regulam a expressão e função neuronal, com efeito na plasticidade sináptica. Os microRNAs tem sido uma evolução nos papel de isquemia cerebral, traumas cerebrais, lesões medulares e na recuperação pós-isquemia (SAUGSTAD, 2010).

Estudos recentes tem investigado o padrão de expressão dos miRNAs nas lesões causadas pela isquemia cerebral, visto que os mesmos comprovadamente participam das atividades cerebrais fisiológicas normais assim como no excitotoxicidade. A ação pós-transcricional rápida dos miRNAs e a sua capacidade de regular simultaneamente muitos genes faz dos mesmos os promissores alvos terapêuticos (Ouyang et al., 2014).

2.7. Exercício Físico e microRNAs

O exercício físico é essencial na nossa rotina diária para mantermos o bem estar geral do corpo e em especial do sistema nervoso. Nas últimas décadas muitos estudos evidenciam que o exercício físico melhora as habilidades cognitivas e a falta de exercício pode levar a incidência de várias desordens neurológicas (Fernandes, Arida e Gomez-Pinilla, 2017).

Nas últimas décadas os miRNAs têm se destacado como potenciais biomarcadores cerebrais envolvidos em muitos mecanismos moleculares como proliferação, diferenciação, apoptose, plasticidade sináptica e memória. Várias pesquisas demonstram que o exercício físico pode minimizar os efeitos das lesões cerebrais traumáticas assim como do envelhecimento através da regulação dos miRNAs. Nessa ação neuroprotetora dos miRNAs pôde ser observada associação da preservação das funções cognitivas, sendo que alguns miRNAs apresentam-se com níveis de expressão aumentados, como por exemplo, os miRNAs: miR-21, miR-34, 28a, miR-98a, miR-148b, miR-7a e miR-15b, e outros com níveis de expressão diminuídos: miR-105 e miR-133b (Fernandes, Arida e Gomez-Pinilla, 2017).

Bao et al. (2014), realizaram experimentos com camundongos submetidos a exercício físico após lesão cerebral traumática. Foram avaliados a aquisição de aprendizagem espacial e retenção de memória. Em seguida, análises de microarray de miRNAs no hipocampo foram empregadas. Os resultados demonstraram 32 miRNAs diferencialmente expressos, sendo que 20 apresentaram-se hiperexpressos e 12 hipoexpressos. Os autores também constataram que o exercício físico pode facilitar a plasticidade neuronal e melhorar a função cognitiva, visto que os resultados demonstraram que o exercício recuperou os déficits cognitivos no hipocampo. Os autores concluíram

que mecanismos epigenéticos regulados pelos miRNAs podem estar envolvidos na melhora cognitiva induzida pelo exercício físico.

Existem miRNAs específicos envolvidos na resposta dos diferentes tipos de exercício físico com um papel importante nos diferentes tipos de fibras musculares e no perfil de expressão gênica tanto em adultos quanto na população de idosos. Na atenção aos cuidados com a saúde envolvendo exercício físico são crescentes os números de pesquisas que evidenciam o papel dos miRNAs na estimulação ou inibição dos processos biológicos. Muitos miRNAs são mediadores essenciais nas adaptações da musculatura estriada cardíaca e estriada esquelética tanto na hipertrofia muscular quanto no processo de regeneração das mesmas em adultos e idosos. Esses miRNAs especificamente envolvidos com as fibras musculares são denominados de myomiRs (entre eles: miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208, miR-208b, miR-486 e miR-499) e controlam também o processo de miogênese (ULTIMO et al., 2018).

Pouco se sabe sobre o papel do exercício nas doenças cerebrovasculares em especial no processo de isquemia cerebral e na regulação dos receptores de neurotransmissores. Portanto, elucidar o papel do microRNAs nos mecanismos envolvidos no desequilíbrio dos receptores dos neurotransmissores NMDA e GABA_A com os benefícios promovidos pelo exercício físico na isquemia cerebral, poderá contribuir com novos conhecimentos.

HIPÓTESE

3. HIPÓTESE

Nossa hipótese é que alguns microRNAs, que tem como alvo receptores de neurotransmissores NMDA e GABA_A, possam estar associados às vias moleculares envolvidas na isquemia cerebral associada ao exercício físico.

OBJETIVO

4. OBJETIVO

A partir de um modelo experimental de isquemia cerebral por oclusão da artéria cerebral média durante 60 minutos seguida de reperfusão de 24 horas com a realização dos treinamentos físicos pré-isquemia focal nosso objetivo foi avaliar a expressão dos miRNAs: miR-15b, miR-29b, miR-219 e miR-222 no tecido (foco isquêmico).

MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 280 a 310 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Durante o período pré-operatório, os animais de todos os grupos foram mantidos em gaiolas plásticas (38x23x15cm - em número de três ratos em duas gaiolas e quatro ratos em uma gaiola), com tampa metálica tipo grade, forradas com maravalha. A temperatura ambiente foi mantida em torno de 25^oC com exaustão do ar ambiente contínuo e ciclo claro/escuro de 12 horas (início do ciclo às 7:00 horas). Os animais receberam água e ração balanceada (Nuvilab CR1 - Nuvital®) *ad libitum*, no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

5.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

Grupo Controle (C): foi constituído por 12 animais que após a anestesia e a estabilização das variáveis biológicas, foram submetidos à eutanásia sem a realização do procedimento cirúrgico.

Grupo Isquemia Cerebral (I): foi constituído por 12 animais submetidos à isquemia focal por oclusão da ACM durante 60 minutos, seguido

por reperfusão de 24 horas, foram submetidos à eutanásia após quatro semanas.

Grupo Exercício Físico (EF): foi constituído por 12 animais que após os treinamentos físicos, foram submetidos à eutanásia sem a realização do procedimento cirúrgico.

Grupo Exercício Físico + Isquemia cerebral (EF+I): foi constituído por 12 animais que após a realização dos treinamentos físicos pelo período de quatro semanas, foram submetidos à isquemia focal por oclusão da ACM durante 60 minutos, reperfusão de 24 horas e posteriormente submetidos à eutanásia.

Os fios obstrutores utilizados durante a oclusão da ACM para a indução de isquemia foram confeccionados pela técnica de recobrir uma das extremidades com silicone (CARLOTTI JR; COLLI; KAZUO, 2001; KOIOSUMI et al., 1986). Os fios (Mononylon 4.0 – Ethicon) foram mantidos estendidos durante 24 horas para corrigir as curvaturas formadas pela posição em que são embalados, e em seguida, foram seccionados em segmentos de 25mm, com lâmina de barbear de aço, e por fim, colocados entre as folhas de um livro, deixando-se uma de suas extremidades livre. Esta extremidade foi recoberta com uma camada de silicone (Silon F – Dimetil Polisiloxano, Aroma de Menta e Corante Artificial) e do catalisador (Silon C – Octoato de Estanho e Silicato de Etila) da Herp Produtos Dentários Ltda, na proporção de 5:1, com a utilização de microscópio cirúrgico (D.F. Vasconcelos). A mistura foi colocada na extremidade de uma pinça de microcirurgia e então distribuída suavemente sobre o fio, para a maior uniformidade possível. A extensão da camada de

silicone utilizada foi de 5 mm, medida com uma régua milimétrica colocada ao lado do fio durante o procedimento.

5.3. Procedimentos gerais

Os procedimentos gerais básicos foram realizados no Laboratório de Neurocirurgia Experimental do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, seguindo-se os passos técnicos descritos no trabalho de Carlotti Jr; Colli e Kazuo (2001).

Os animais foram distribuídos nos respectivos grupos aleatoriamente, após sorteio realizado antes do procedimento cirúrgico. Cada animal foi pesado e submetido à anestesia geral por inalação de halotano, sob uma campânula de vidro. Assim que a movimentação espontânea terminava, os animais eram transferidos para uma prancha de madeira, mantidos em decúbito dorsal e entubados manualmente com uma cânula orotraqueal, somente após tração digital da língua para o exterior. A extremidade da cânula era conectada a um respirador desenvolvido para animais de pequeno porte (CR-BION – Ribeirão Preto, Brasil), com manutenção da pressão endotraqueal entre 8 a 10 mmHg, iniciando-se a vaporização contínua com halotano.

Os animais foram então fixados com esparadrapos à prancha de madeira pelos seus membros. A artéria ventral da cauda foi dissecada e canulada com cateter calibre PE 10, que conectado na outra extremidade a um cateter peridural, eram conectados a um transdutor de pressão, para registro contínuo da pressão arterial média e da frequência cardíaca (biomonitor

modelo 78339A – Hewlett Packard Company, USA) e para coleta de amostras sanguíneas.

A manutenção da vaporização foi controlada de acordo com a pressão arterial média, para que fosse mantida entre 80 e 100 mmHg. Após quinze minutos de ventilação mecânica, foi colhida uma amostra de sangue arterial para a realização de gasometria (gasômetro portátil modelo I-STAT portable clinical analyse - ABBOTT Laboratories Inc.) com utilização de cartucho I-STAT cartridge cg8+), para dosagens da $paCO_2$, da paO_2 e do pH e dosagem de glicemia, hemoglobina e hematócrito. Para os animais dos grupos I, a coleta foi repetida nos quinze minutos finais da isquemia, para as dosagens dos mesmos parâmetros.

Um novo exame para verificar os parâmetros gasométricos foi realizado quando os valores de pCO_2 não estiverem nos parâmetros aceitáveis (entre 34 e 42 mmHg). Para isso, alterações na pressão endotraqueal ou na frequência do respirador foram realizadas. A temperatura corporal foi controlada com um termômetro digital posicionado no reto do animal e mantida entre 37 - 38°C com incidência de uma fonte de calor (lâmpada incandescente 220 V), quando necessária. Após a estabilização do animal, o procedimento cirúrgico para indução da isquemia foi iniciado.

O procedimento cirúrgico para oclusão da ACM foi iniciado com a tricotomia da região cervical anterior, incisão mediana da pele, tela subcutânea e do músculo platisma, seguido pelo tracionamento digital lateral até a exposição do músculo esternomastóideo ínfero-lateralmente, o músculo omohióideo látero-superiormente e o músculo esternohióideo medialmente.

O campo operatório foi exposto com dois afastadores tipo gancho, com leve tração, sendo um medial e outro lateral, e fixos com esparadrapo na prancha, para facilitar a visualização das estruturas anatômicas. Posteriormente, o microscópio cirúrgico (DF – Vasconcelos) foi introduzido no campo operatório para a identificação e exposição da bainha carótica e então da artéria carótida comum esquerda (ACCE). A dissecação prosseguia superiormente até sua bifurcação com a identificação da artéria carótida interna esquerda (ACIE) e da artéria carótida externa esquerda (ACEE).

A ACE foi dissecada no sentido cranial e seus ramos coagulados e seccionados. A ACI também foi dissecada em todo o seu trajeto extracraniano, incluindo a origem da artéria pterigopalatina e sua continuação cranial. A ACE foi ligada o mais cranial possível com fio de algodão (4.0 – Ethicon), para a introdução retrógrada do fio obstrutor de mononylon 4-0 (2,5 cm de comprimento) com extremidade engrossada com mistura de silicone na extensão de 5 mm (por KOIOSUMY et al. (1986); modificada por CARLOTTI JR; COLLI; KAZUO, 2001). Foram colocados microclipes temporários junto à emergência da APP, para impedir a migração do fio obstrutor para o interior da sua luz; na ACC, para interromper o seu fluxo e, na continuação cranial da ACI, para evitar o refluxo de sangue.

A ACE foi seccionada e a partir do seu coto proximal, foi introduzido o fio obstrutor retrogradamente até a ACC e depois cranialmente pela ACI, após a retirada do microclipe que ocluía este vaso, até sentir resistência na sua progressão. Os microclipes da ACC e da APP permaneceram no local.

Em seguida, foi medida a distância da bifurcação da ACC até o coto proximal do fio obstrutor, com valor aceitável entre 0.5-0.7 cm, sendo, portanto,

a medida do segmento do fio entre a bifurcação da ACC e a sua extremidade distal de 18 a 20 mm. Isto indicava que o fio penetrou o suficiente para ocluir o óstio de origem da ACM (Figura 2) (CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001; KOIOSUMY et al., 1986).

O coto da ACE foi ligado com fio 10-0 para evitar refluxo de sangue e o microclipe da ACCE foi retirado, permitindo sua reperfusão. Os animais foram mantidos em condições estáveis durante o período de isquemia. Depois de decorrido o período de 60 minutos de isquemia focal, procedia-se a retirada do fio obstrutor, recolocando o clampe temporário na ACC e ACI para evitar o fluxo de sangue na primeira e o refluxo na segunda. O coto proximal da ACE era ligado definitivamente (fio de algodão 4.0 – Ethicon), retirando-se os clampes temporários. Em seguida a pele e a tela subcutânea eram fechadas com fio mononylon 3-0.

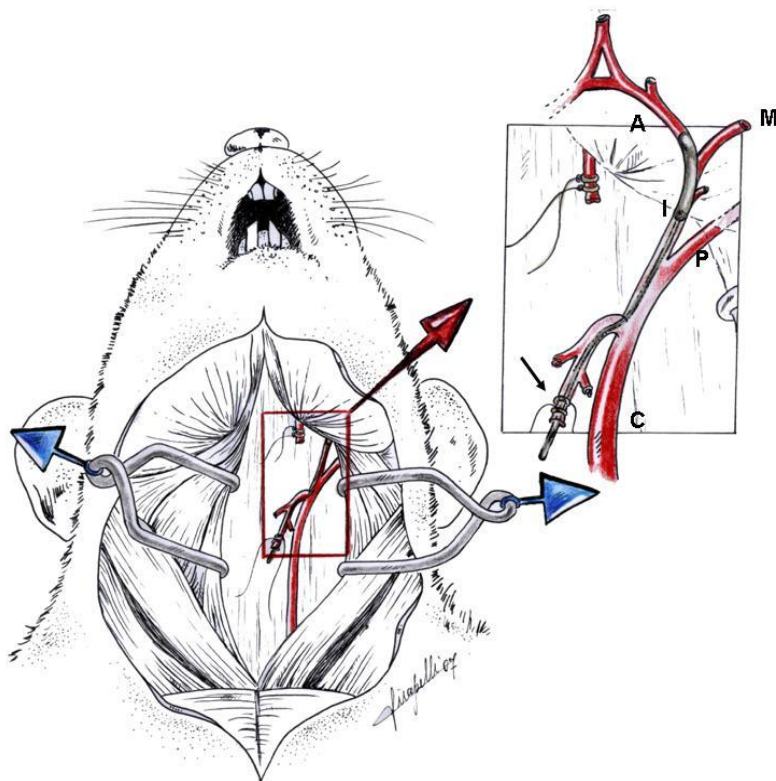


Figura 2. A. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da ACME (M) (no detalhe superior direito) e a ligadura da ACE-E na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). Por fim, a reperfusão da ACC-E (C) é permitida após a retirada do seu microclipe. Artéria carótida interna esquerda (I); artéria cerebral anterior esquerda (A); artéria pterigopalatina esquerda (P). (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

Para os animais dos grupos I e EF+I, após a reperfusão, a estabilidade dos parâmetros vitais foi observada e, em seguida, foi feita a sutura contínua da pele com fio mononylon 5-0. Uma vez estável o animal, o anestésico inalatório foi suspenso, permitindo sua recuperação e, após a retomada da respiração espontânea, a cânula orotraqueal foi retirada e o animal recolocado à sua gaiola plástica, com oferta livre de água e ração.

Após decorrido o período de reperfusão previsto (24 horas), o animal foi anestesiado através da inalação de halotano (colocado sob uma campânula de vidro) e em seguida, foi posicionado em decúbito dorsal em uma prancha de madeira. A retirada do encéfalo foi iniciada com uma tesoura Mayo, através de um corte transversal na região nugal para a separação do crânio da coluna vertebral cervical.

Em seguida foi efetuado um corte interorbital, seguido de um corte sagital occipito-frontal, que permitirá o afastamento lateral dos ossos por meio de tração digital auxiliado por pinças hemostáticas. Dessa forma, o encéfalo foi exposto e removido após secção dos nervos cranianos, utilizando-se micropinça. Durante estes procedimentos, os encéfalos foram submetidos à irrigação contínua com soro fisiológico à 0°C em uma placa de Petri.

5.4. Programa de exercício físico em esteira

Os animais passaram por um período de aclimatação por cinco dias com velocidades (5 a 18m/min) e durações (5 a 15 min) progressivas. O objetivo do período de adaptação foi reduzir os níveis de estresse apresentados durante a manipulação e a utilização da esteira (MANCHADO et al., 2006).

O protocolo é composto por um período total de 4 semanas. O aquecimento consiste em 2 min a velocidade de 5 m/min e esta foi gradativamente aumentada até atingir a velocidade de 18 m/min em que os animais ficaram por 30 minutos sempre com 0° de inclinação. (FERREIRA et al., 2007; STRADECKI-COHAN, 2017).

Os animais que demonstraram quaisquer sinais de cansaço ou inadaptação ao uso da esteira, o exercício foi interrompido. Durante os treinos não foram utilizados choques elétricos nos animais, somente leves toques com as mãos para estimulá-los. Na situação persistência, este animal foi retirado da esteira para que pudesse descansar e se recuperar. O treino só recomeçou quando o animal estava completamente recuperado.

5.5. Análise da expressão dos microRNAs

Para a análise da expressão gênica, foi obtido de cada animal um fragmento (retirado com um punch) e 1ml de sangue. As amostras de sangue foram coletadas em tubo com EDTA e centrifugadas 10' por 2500 rpm e o "buffy coat" foi transferido para um tubo de 15ml. A seguir, foi lavado com tampão para lise de glóbulos vermelhos e mantido por 15' em gelo. Na sequência, seguiu-se mais uma centrifugação e mais uma lavagem com tampão lise de glóbulos vermelhos. Para a obtenção do pellet, a amostra foi centrifugada por 10' a 2500 rpm. Adicionou-se 250µl de PBS (*phosphate-*

buffered saline) e 750µl de Trizol (*Invitrogen*, EUA) para congelamento a -80 °C. Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA.

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do miRNA, a transcrição reversa foi realizada utilizando o *kit comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de RT Buffer; seguido de 0,075µl de dNTP's; 1,5µl de Primers específicos (miRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima *MultiScribe™*, 0,094µl de *RNase out (1.9U)*, completando com água DEPC o volume final de 7,5µl. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e, em seguida, realizada a 4°C. Para o PCR em tempo real, foi utilizado 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a expressão diferencial dos microRNAs. A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RQ-PCR), com a utilização do reagente *TaqMan Master Mix (Applied Biosystems)*.

Foi utilizado o sistema disponível comercialmente *TaqMan Assay-on-demand*, composto por oligonucleotídeos e sondas (*Applied Biosystems*) para a análise quantitativa da expressão dos microRNAs. Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normatizados.

O CT determinado para uma amostra (para um determinado gene) é subtraído do CT determinado para um gene *house-keeping* (neste caso o U6) para o miRNA na mesma amostra, originando o chamado Δ CT. Os valores de Δ CT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o Δ CT de uma amostra do Δ CT do calibrador (neste caso utilizamos a média das amostras do grupo controle) resulta no $\Delta\Delta$ CT. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata. A amplificação foi realizada em um volume final de 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico *Taqman Master Mix*, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l de cDNA. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) foi utilizado juntamente com o software *Sequence Detection System* para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de Δ CT. O software *GraphPad Prism 4.0* (*GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA*), foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística.

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 *Sequence Detection System* (*Applied*

Biosystems). Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS “software package”.

5.6. Análise estatística

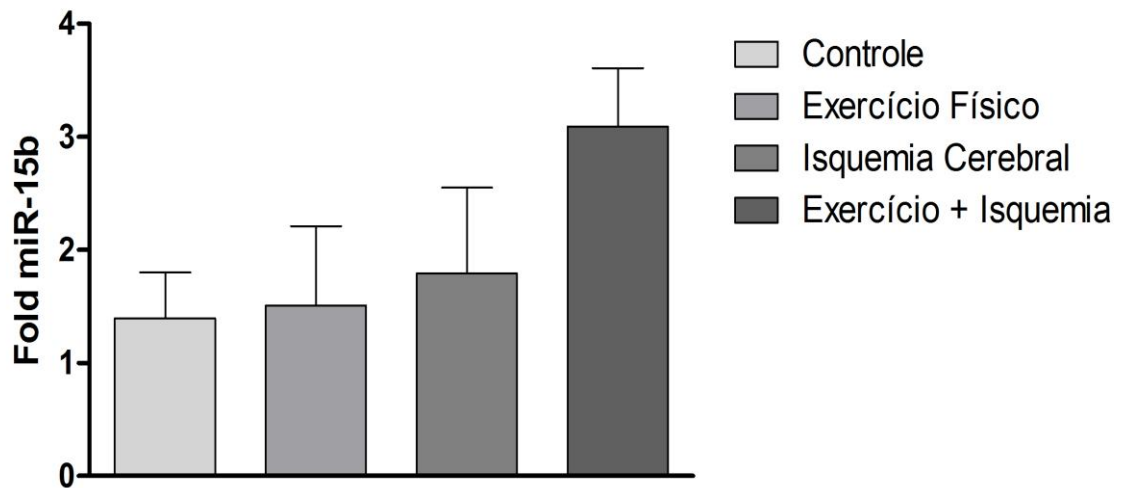
Para a avaliação da expressão dos miRNAs a análise estatística foi realizada utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de comparação múltipla de *Dunns*. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism version 6.00 for Windows*, (*GraphPad Software, San Diego – Califórnia USA*), sendo considerado estatisticamente significante valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. miRNA-15b

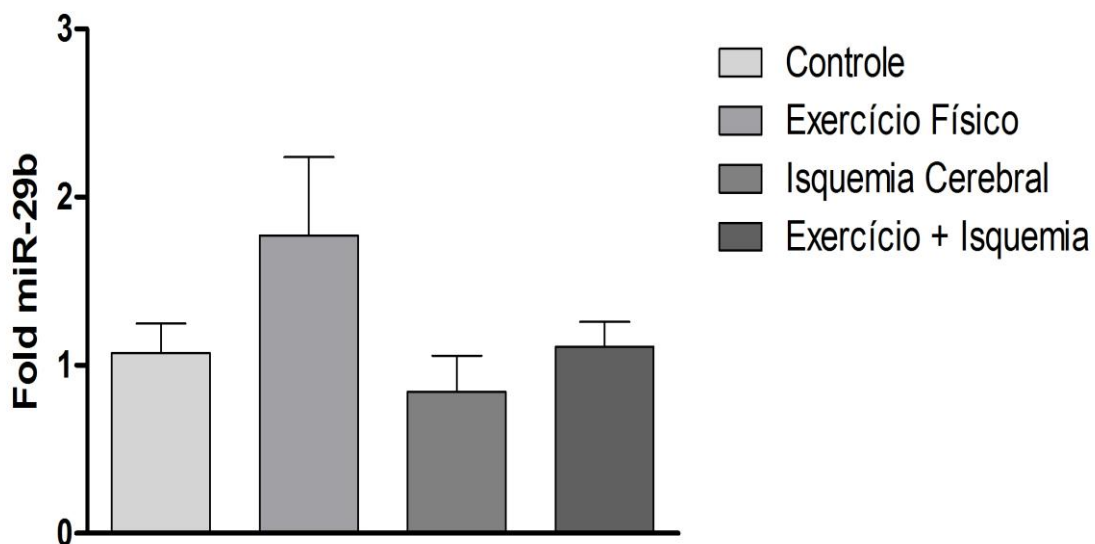
Gráfico 1. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-15b entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p = 0,1517$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 6.00).

6.2 miRNA-29b

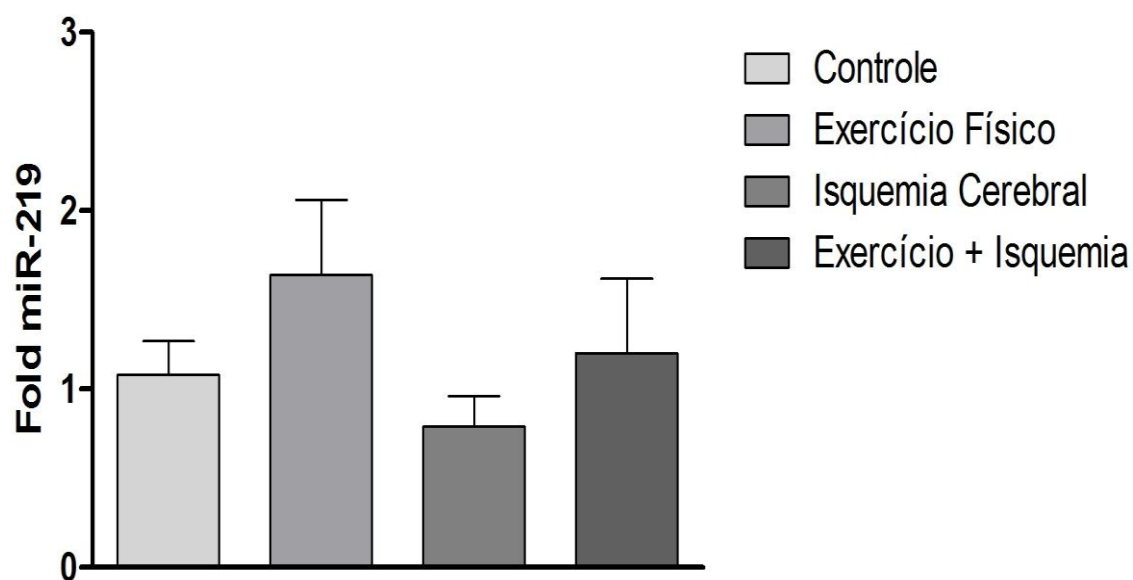
Gráfico 2. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-29b entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p = 0,3680$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 6.00).

6.3 miRNA-219

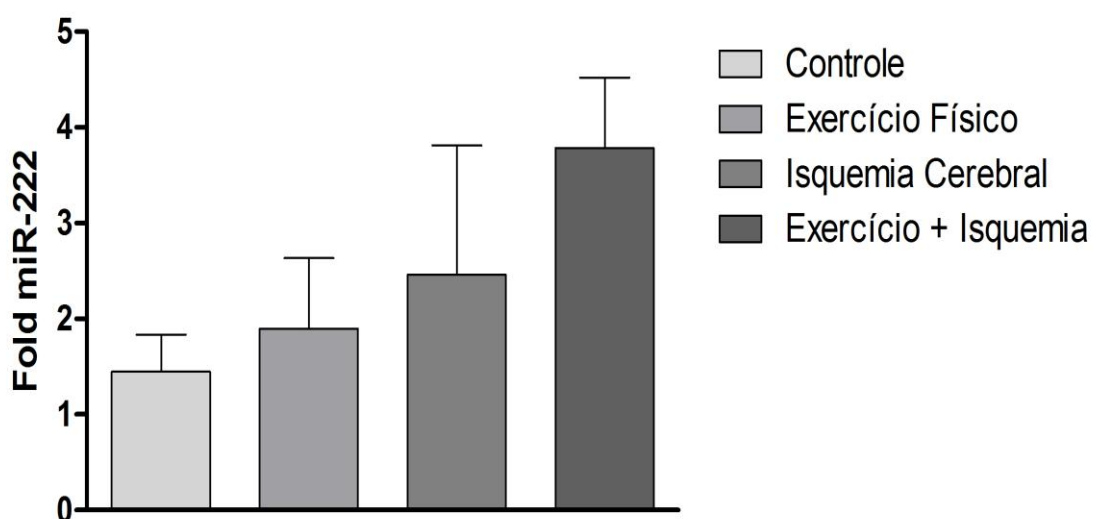
Gráfico 3. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-219 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p = 0,5518$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 6.00).

6.4. miRNA-222

Gráfico 4. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-222 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p = 0,1943$, Kruskal Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 6.00).

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A prática de exercício físico com regularidade é um importante fator para manutenção de uma vida saudável, visto que, evidências demonstram sua associação com baixo risco de mortalidade e baixa incidência de doenças crônicas mais prevalentes, tais como: doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e alguns tipos de câncer: próstata, colo, mama, etc. Também pode-se destacar os benefícios do exercício físico em doenças psíquicas como a depressão, por exemplo (Fernández-Sanjurjo et al. 2018).

Este trabalho visou avaliar a expressão de alguns miRNAs previamente identificados como reguladores de receptores de neurotransmissores em animais submetidas a isquemia cerebral focal associada ao exercício.

Pesquisas apontam os miRNAs como potenciais biomarcadores para os diferentes intensidades de treinamentos de exercício físico envolvidos diretamente em vários processos fisiológicos e com resposta diferente dependendo da intensidade aplicada durante o treinamento (SCHMITZ et al., 2018).

A busca da elucidação de quais vias moleculares estão associadas a neuroproteção proporcionada pelo exercício físico, durante o acidente vascular cerebral poderá contribuir efetivamente para minimizar os danos causadas por essa doença. Nesse contexto destacam-se os miRNAs como moduladores da

expressão dos receptores de neurotransmissores sabidamente envolvidos no processo isquêmico.

A família dos miR-15 (miR-15a e miR-15b) está envolvida com o aumento da expressão de genes do ciclo celular, sendo que a inibição dos mesmos em camundongos adultos submetidos a modelo de isquemia e reperfusão promove neuroproteção. A inibição do miR-15 promove aumento dos níveis de expressão de genes responsáveis pela funções mitocondriais, sobrevivência celular e bloqueio da apoptose (OOI, BERNARDO, MCMULLEN, 2014).

ALTINTAS et al. (2016), avaliaram a expressão perfil de miRNAs, entre eles o miR-15, em ratos submetidos a modelo de isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média (MCAo) e diabetes (DM) induzido por Streptozotocin (STZ). Foi realizado pré-condicionamento isquêmico (IPreC) por 72h antes da MCAo transitória para avaliar um efeito neuroprotetor contra a isquemia e reperfusão. O nível de expressão do miR-15 não esteve alterado nos grupos DM e MCAo; entretanto, foi observado hipoexpressão do mesmo no grupo IPreC.

Nossos resultados corroboram com Altintas et al. (2016), visto que, também não observamos diferenças nos níveis de expressão do miR-15b nos grupos estudados.

A família dos miR-29 é constituída de três membros (miR-29a, miR-29b e miR-29c). Os miRNAs miR-29a e miR-29b estão presentes no cromossomo 6 em camundongos e no cromossomo 7 em humanos, enquanto o miR-29c no cromossomo 1 em ambas as espécies. Os miRNAs miR-29a e

miR-29b estão diretamente envolvidos na regulação do desenvolvimento cerebral e apresentam elevados níveis de expressão no cérebro desses animais quando adultos. A família dos miR-29 é predominantemente mais expressa em astrócitos quando comparada aos neurônios (Ouyang et al., 2014).

Bao et al. (2014) investigaram a expressão do miR-29b na neurodegeneração associada ao acidente vascular cerebral isquêmico (AVC) agudo pela oclusão da artéria cerebral média. Foi observado que o aumento nos níveis de expressão do miR-29b teve ação neuroprotetora e em contrapartida a inibição de miR-29b potencializou a morte celular neural. Os autores concluíram que este trabalho fornece a primeira evidência de que a perda de miR-29b no foco isquêmico é um fator chave para a lesão do AVC.

Em nosso trabalho não observamos diferenças nos níveis de expressão do miR-29b nos grupos estudados, nos permitindo sugerir que as condições do desenho experimental como, por exemplo, a duração do período de isquemia assim como o tempo de reperfusão pode estar diretamente associado ao padrão de expressão do miR-29b.

Schmitz et al. (2018) constataram aumento dos níveis de expressão dos miRNAs miR-222 e miR-29c induzidos por High-intensity interval training (HIIT) em indivíduos adultos tanto em homens quanto em mulheres. Os autores associaram ambos miRNAs como potenciais biomarcadores cardíacos em resposta ao HIIT com diferenças significativas evidenciadas no estudo entre repouso e exercício físico.

Liu et al. (2015) observaram aumento nos níveis de expressão do miR-222 no sangue após exercício com bicicleta ergométrica e descrevem que o exercício físico proporciona proteção cardíaca sendo uma promissora ferramenta para terapias regenerativas. Entretanto, pouco se sabe sobre os fenótipos cardíacos envolvidos nesse processo e sugerem que mais estudos são necessários para o entendimento do papel dos miRNAs na regeneração dos cardiomiócitos, pois poderão contribuir para implicações clínicas importantes.

Apesar de não observarmos diferença estatística significativa em nosso estudo, o miR-222 apresentou níveis de expressão aumentados nos animais submetidos a isquemia cerebral associado ao exercício físico. Portanto, os nossos resultados corroboram tanto com Schmitz et al.(2018) quanto com Liu et al.(2015). Ambos trabalhos demonstraram o papel protetor do exercício físico com aumento da expressão do miR-222 no sistema cardiovascular que nos leva a sugerir uma possível ação vascular sistêmica deste miRNA visando também a regeneração cerebrovascular.

O miR-219 é um miRNA cerebral específico “brain-specific miRNA” e regula negativamente a expressão dos receptores do neurotransmissor NMDA, sendo envolvido com várias doenças do Sistema Nervoso e apresenta níveis de expressão diminuídos em modelo experimental de epilepsia assim como no líquido cefalorraquidiano de pacientes epiléticos (Zheng et al., 2016).

Em estudo prévio do nosso grupo, a partir de um modelo isquemia cerebral experimental por oclusão da artéria cerebral média durante 90 minutos, seguida por reperfusão de 48 horas, associada ou ao alcoolismo

crônico experimental, a expressão do miRNA-219 foi avaliada no sangue e no tecido dos animais pela técnica PCR em tempo. Também foram analisadas a expressão gênica e protéica do receptor do neurotransmissor NMDA no tecido do foco isquêmico desses animais. A expressão do miR-219 no tecido cerebral foi menor nos grupos submetidos à isquemia cerebral, ao alcoolismo e na associação dos dois grupos quando comparados ao grupo controle. Entretanto, no sangue, a expressão do miR-219 foi menor nos grupos submetidos ao alcoolismo e no grupo onde houve a associação do alcoolismo à isquemia cerebral, quando comparados ao grupo controle. Também foi observado que a expressão gênica e protéica do receptor do neurotransmissor NMDA no tecido cerebral foi maior nos grupos submetidos à isquemia cerebral, ao alcoolismo e na associação dos dois grupos quando comparados ao grupo controle. Os autores sugerem uma possível modulação do receptor NMDA NR1 pelo miR-219, com correlação inversa entre a expressão do receptor do neurotransmissor NMDA NR1 e do miR-219.

Em nossos resultados não constatamos diferenças nos níveis de expressão do miR-219 nos grupos estudados. Por se tratar se um miRNA específico do tecido cerebral, talvez ocorra um competição entre miRNA com ações antagônicas, como descrito em outros artigos científicos em outras condições experimentais e outras doenças do Sistema Nervoso.

Novos estudos são necessários para elucidar a interação entre a fisiopatologia da isquemia cerebral associada ao exercício físico. Outros miRNAs necessitam ser avaliados e com diferentes tempos de duração da isquemia cerebral assim como com diferentes períodos de reperfusão.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Em nosso estudo não observamos diferenças estatísticas significativas na expressão dos miRNAs miR-15b, miR-29b, miR-219 e miR-222 no tecido cerebral nos grupos submetidos à isquemia cerebral, ao exercício físico e na associação dos dois grupos quando comparados ao grupo controle. Entretanto, os miRNAs miR-15b e miR-222 apresentaram níveis de expressão aumentados no grupo do exercício físico associado à isquemia cerebral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR. S.A.; PINHO, A.R. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. *Rev Bras Med Esporte*,v. 13,p.355 -360, 2007.

ALTINTAS O., OZGEN ALTINTAS M., KUMAS M., ASIL T. Neuroprotective effect of ischemic preconditioning via modulating the expression of cerebral miRNAs against transient cerebral ischemia in diabetic rats. *Neurol Res.* Nov;38(11):1003-1011. 2016.

ANG, E.T.; WONG, P.T.H.; MOOCHHALA, S.; NG, Y.K. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience*,v. 118,p. 335–345, 2003.

ARRIBAS, P.R.; GUTIÉRREZ, M.A.; HERMÁNDEZ, S.P.; GARVI, P.M.J.; GUIU, M.J.; RODA, M.J.; ALBACAR, B.A.J. Modelos experimentais de isquemia cerebral. *Rev Neurol*,v.v47,p.414- 426, 2008.

BAO, T.H.; MIAO, W.; HAN, J.H.; YIN, M.; YAN, Y.; WANG, W.W.; ZHU, Y.H.; Spontaneous running wheel improves cognitive functions of mouse associated with miRNA expressional alteration in hippocampus following traumatic brain injury'. *J. Mol. Neurosci.* 54 (4), 622–629. 2014.

BEDERSON, J. B.; PITTS, L. H.; TSUHI, M.; NISHIMURA, M. C.; DAVIS, R. L.; BARTKOWSKI. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*,v.17, p. 472-476, 1986.

BENARROCH, E.E. GABA_A receptor heterogeneity, function, and implications for epilepsy. *Neurology*, v. 68, p. 612-614, 2007.

BEVERIDGE, J.N.; TOONEY, A.P.; CARROLL, P.A.; GARDINER, E.; BOWDEN, N.; SCOTT, J.R.; TRAN, N.; DEDOVA, I.; CAIRNS, J.M. Dysregulation of miRNA 181b in the temporal cortex in schizophrenia. *Hum. Mol. Genet*,v.17,p. 1156-1168, 2008.

BRESSAN, R.A.; PILOWSKY, L.S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. *Rev.Bras. Psiquiatr*, v. 25, p. 117 -183, 2003.

BRODAL, P. The hippocampal formation: Learning and memory. In: Brodal, P. (Ed.). *The Central Nervous System*. New York: Oxford University Press, p. 473-482, 2010.

BRONNER, L.L.; KANTER, D.S.; MANSON, J.E. Primary prevention of stroke. *J. Med*, v. 33, p. 1392 – 1400, 1995.

CARLOTTI JR, C.G.; COLLI, B.O.; KAZUO, J.Y. Avaliação da isquemia cerebral pela respiração mitocondrial. Arq Neuropsiquiatria, v. 59, p. 365-371, 2001.

CHANRAUD, S.; MARTELLI, C.; DELAIN, F.; KOSTOGIANNI, N.; DOUAUD, G.; AUBIN, H.; REYNAUD, M.; MARTINOT, J. Brain morphometry and cognitive performance in detoxified alcohol-dependents with preserved psychosocial functioning. Neuropsychopharmacology, v. 32, p. 429–38, 2007.

CHEN, S.T.; HSU, C.Y.; HOGAN, E.L.; MARICQ, H.; BALENTINE, J.D. A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. Stroke, v.17, p. 738-743, 1986.

COIMBRA, N.C.; FREITAS, R.L.; SAVOLDI, M.; CASTRO-SOUZA, C.; SEGATO, E.N.; KISHI, R.; WELTSON, A.; RESENDE, G.C.C. Opioid neurotransmission in the post-ictal analgesia: involvement of analgesia: Involvement of μ_1 -opioid receptor. Brain Research, v.903, p. 216-221, 2001.

COIMBRA, N.C.; EICHENBERGER, G.C.D.; GORCHINSKI, R.T.; MAISINETTE, M. Effects of the blockade of opioid receptor on defensive reactions elicited by electrical stimulation within the deep layers of the superior colliculus and DPAG. Brain Research, v.736, p.348-352, 1996.

COLLI, B.O.; SILVA, M.N.; CARLOTTI JR, C.G. Isquemia cerebral experimental. In: Silva Jr OC, Zucoloto S, Beer Jr A. Modelos Experimentais de Pesquisa em Cirurgia. Editora Robe, São Paulo, v.65,P.643-662, 1998.

CONTI, A.; AGUENNOUZ, H.; TORRES, L.D.; TOMASELLO, C.; CARDALI, S.; ANGILERI, F.F.; MAIO, F.; CAMA, A.; GERMANO, A.; VITA, G.; TOMASELLO, F. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II–IV astrocytic tumors. J Neurooncol,v.93, p. 325-332,2009.

DAMBINOVA, S.A.; BETTERMANN, K.; THEODORE, G.; MATTHEW, T.; OLSON, D.; WEISSMAN, J.D.; SOWELL, R.L. Diagnostic potential of the NMDA receptor peptide assay for acute ischemic stroke. Plos One, v. 7, p. 1-7, 2012.

DENENBERG, V. Open-field test: what does it mean? Ann.N.Y.Acad.Sci, v.159, p. 852- 863, 1969.

DIAS, L.A.A.; COLLI, B.O.; NETTO, J.C.; LACHAT, J.J. Avaliação da isquemia cerebral focal induzida pela oclusão da artéria cerebral média e ação neuroprotetora do cetoprofeno em ratos. Arq Neuropsiquiatr, v.58, p. 1047-1054,2000.

DIAZ-HERRERA, P.; GARCIA-CASTELLANO, J.M.; TORRES, A.; MORCUENDE, J.A.; CALBERT, J.A.; SARRAT, R. Effect of high-intensity running in rectus femoris muscle fiber in rats. *Journal of Orthopaedic Research*, New York, v.19, n.2, p. 229- 32, 2001.

DING, Y.H.; YOUNG, C.N.; LUAN, X.D.; LI, J.; RAFOLS, J.A; CLARK, J.C.; MCALLISTER, J.P.; DING, Y.C. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropathol*,v.109, p.237–246, 2005.

DHARAP, A.; BOWEN, K.; PLACE, R.; LI, L.C.; VEMUGANTI, R. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 29, n. 4, p. 675-687, 2009.

DHIRAJ, D.K.; CRYSTANTHOU, E.; MALLUCI, G.R.; BUSHELL, M. miRNAs-19b, -29b-2* and -339-5p show an early and sustained up-regulation in ischemic models of stroke. *Plos One*, v. 8, p. e83717, 2013.

DHODDA, V.K.; SAIOLOR, K.A.; BOWEN, K.K.; VEMUGANTI, R. Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *Journal of Neurochemistry*, v. 89, p. 73-89, 2004.

DONOGHUE, J.P.; SUNER, S.; SANES, J.N. Dynamic organization of primary motor cortex output to target muscles in adult rats. II. Rapid reorganization following motor nerve lesions, v.79, p. 492-503, 1990.

ENOCH, MA. The role of GABA_A receptors in the development of alcoholism. Pharmacology, biochemistry and behavior, v. 90, p. 95-104, 2008.

EKAM, I.I. Neurociência fundamental para reabilitação. Neuroplasticidade. Rio de Janeiro, Guanabara, 2000.

FARIELLO, R.G.; FORCHETTI, C.M.; FISHER, R.S. GABAergic functions in relation to seizure phenomena. In: Fisher R.S.; Coyle J.T. (Ed). Neurotransmitter and Epilepsy. New York: Wiley-Liss, p. 77-93, 1991.

FERNANDES, J.; ARIDA, R.M.; GOMEZ-PINILLA, F. Physical exercise as an epigenetic modulator of brain plasticity and cognition. Neurosci Biobehav Rev. 2017 Sep;80:443-456.

FERNÁNDEZ-SANJURJO, M.; DE GONZALO-CALVO, D.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, B.; DÍEZ-ROBLES, S.; MARTÍNEZ-CANAL, Á.; OLMEDILLAS, H.;

DÁVALOS, A.; IGLESIAS-GUTIÉRREZ, E. *Circulating microRNA as Emerging Biomarkers of Exercise*. *Exerc Sport Sci Rev*. Jul;46(3):160-171. 2018.

FOELLER, E.; CELIKEL, T.; FELDMAN, D.E. Inhibitory sharpening of receptive fields contributes to whisker map plasticity in rat somatosensory cortex. *J. Neurophysiol.*, v.94, p. 4387-4400, 2005.

GILLUM, R.F.; INGRAM, D.D. RELATION BETWEEN RESIDENCIA IN SOUTHEAST REGION OF THE United States and stroke incidence. *Am.I.Epidemiol*,v.144, p.665-673, 1996.

GORJI, A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Rev*, v.60, p.33-38, 2000.

GORINI, G.; NUNEZ,Y.O.; MAYFIELD, D. Integration of miRNA and protein profiling reveals coordinated neuroadaptations in the alcohol-dependent mouse brain. *Plos One*, v. 8, p. 1-13, 2013.

HARPER, C. The Neuropathology of Alcohol-Related Brain Damage. *Alcohol & Alcoholism*, v. 44, p. 136–140, 2009.

HARPER, C.; KRIL, J. Patterns of neuronal loss in the cerebral cortex in chronic alcoholic patients. *J Neurol Sci*, v. 92, p. 81–89, 1989.

HEN, J.F.; LUO, Y.M.; WAN, X.H.; JIANG, D. Biogenesis of MiRNA-195 and its role in biogenesis, the cell cycle, and apoptosis. *J Biochem Molecular Toxicology*, v. 25, p. 404-408, 2011.

HENSCK, T.K. Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 6, p. 877-888, 2005.

HILLBOM, M.; JUVELA, S. Alcohol and risk for stroke, In S.Zakhari and M. Wassef (Eds.), *Alcohol and the Cardiovascular System: NIAAA Research Monograph n^o 31*, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, Bethesda, MD, p. 63–83, 1996.

JABLONSKA, A.; LUKOMSKA, B. Stroke induced brain changes: implications for stem cell transplantation. *Acta Neurobiol Exp* ,v.71, p.74 -85, 2011.

JEYASEELAN, K.; LIM, K.Y.; ARMUGAM, A. MicroRNA Expression in the Blood and Brain of Rats Subjected to Transient Focal Ischemia by Middle Cerebral Artery Occlusion. *Stroke*, v. 39, p. 959-966, 2008.

KIM, Y.; LEEM, J.;SIM, J.; JEONG, S.; JOUNG, K. The effects of gabapentin pretreatment on brain injury induced by focal cerebral ischemia/reperfusion in the rat. Korean J anesthesiol. v. 58,p.184-190, 2010

KOIOSUMI, J.; YOSHIDA, Y.; NAKAZAA, T.; ONEDA, G. Experimental studies os ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in wich recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn. J. Stroke, v. 8, p. 1-8, 1986.

LAWLER, S.; CHIACCA, A. Emerging functions of microRNAs in glioblastoma. J Neurooncol, v.92, p.297-306, 2009

LEKER, R.R.; SHOHAMI E. Cerebral ischemia and trauma – different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. Brain Research Reviews, v. 39, p. 55-73, 2002.

LIU, X.; XIAO, J.; ZHU, H.; WEI, X.; PLATT, C.; DAMILANO, F.; XIAO, C.; BEZZERIDES, V.; BOSTRÖM, P.; CHE, L.; ZHANG, C.; SPIEGELMAN, B.M.; ROSENZWEIG, A. miR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. Cell Metab. Apr 7;21(4):584-95. 2015.

LOTUFU, P.A. Mortalidade pela doença cerebrovascular no Brasil. Rev Brasileira de Hipertensão, v. 7, p. 387 -391, 2000.

MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V,L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. Maximal lactate steady in running rats. JEP Online;8:4-11. 2005.

MACDONALD, R.L.; OLSEN, R.W. GABA_A receptor channels. Annu. Rev. Neurosci, v. 17, p. 569-602, 1994.

MELLIOS, N.; HUANG, HS; BAKER, .S.P.; GALDZICKA, M.; GINSS, E., AKBARIAN, S. Molecular Determinants of Dysregulated GABAergic Gene Expression in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. Biol. Psychiatry, v. 65, p. 1006-1014, 2009.

MENDELL, J.T. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. Cell Cycle. v. 9, p. 1179-1184, 2005.

MENZIES, S.A.; HOFL, J.T.; BETZ, A.L. Middle Cerebral artery occlusion in rats: a neurological and anthropological evolution of a reproducible model. Neurosurgery, v. 31, p. 100- 107, 1992.

NAKANO, H.; COLLI, O.B.; ROSELINO, S.R.J. Análise da respiração mitocondrial em tecido cerebral de gato após isquemia e reperfusão. Acta Cirúrgica Brasileira, v.17, 2002.

NICOLOSO, M.S.; CALIN, G.A. MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside. Brain Pathol., v. 18, p.122-129, 2008.

NOTOMI, T.; OKAZAKI, Y.; OKIMOTO, N.; SAITOH, S.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, M. A comparison of resistance and aerobic training for mass, strength and turnover of bone in growing rats. European Journal of Applied Physiology, v. 83, n. 6, p. 469-74, 2000.

OLSEN, R.W.; HANCHAR, H.J.; MEERA, P.; WALLNER, M. GABA_A receptor subtypes: The “one glass of wine” receptors. Alcohol, v. 41, p. 201-209, 2007.

OLSEN, R.W.; SIEGHART, W. International union of pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: Classification on basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. Pharmacological reviews, v. 60, p. 243-260, 2008.

OLSSON, T.; WIELOCH, T.; SMITH, M.L. Brain damage in mouse model of global cerebral ischemia. Effect of NMDA receptor blockade. *Brain Research*, v. 982, p. 260-269, 2003.

OOI, J.Y.; BERNARDO, B.C.; MCMULLEN, J.R. The therapeutic potential of miRNAs regulated in settings of physiological cardiac hypertrophy. *Future Med Chem*. 2014 Feb;6(2):205-22.

OUYANG, Y.B.; XU, L.; YUE, S.; LIU, S.; GIFFARD, R.G. Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: importance of microRNAs. *Neurosci Lett*. 565, 53-58. 2014.

PENASSO, P. Repercussões Clínicas e Histopatológicas do Dimetilsulfóxido em Gerbils submetidos à isquemia cerebral experimental. Dissertação Mestrado- Universidade de Franca, 2005.

PLOUGHMAN, M.; GRANTER BUTTON, S.; CHERNENKO, G.; TUCKER A.B.; MEAROW, M.K.; CORBETT, D. Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-i and insulin-like growth factor after focal ischemia. *Neuroscience*, v. 136, p. 991-1001, 2005 .

PORKKA, P.K.; PFEIFFER, J.M.; ALTERING, K.K.; VESSELLA, L.R.; TAMMELA, J.L.T.; VISAKORP, T. MicroRNA Expression profiling in Prostate Cancer. *Cancer Res*, v.67, p.6130-6135, 2007

PULSINELLI, W. Pathophysiology of the ischemic stroke. *The Lancet*, v. 339, p. 533-536, 1992.

PURVES, D. *Neurociências*. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RADÁK, Z.; TOLDY, A.; SZABO, Z.; SIAMILOS, S.; NYAKAS, C.; SILYE, G.; JAKUS, J.; GOTO, S. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Nerochem*, v. 49, p. 387-392, 2006.

RICARTE FILHO, J.C.; KIMURA, ET. MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. Dec;50(6):1102-7. 2006.

SATHYAN, P.; GOLDEN, H.B.; MIRANDA, R.C. Competing Interactions between Micro-RNAs Determine Neural Progenitor Survival and Proliferation after Ethanol Exposure: Evidence from an Ex Vivo Model of the Fetal Cerebral Cortical Neuroepithelium. *The Journal of Neuroscience*, v.27,p. 8546-8557,2007.

SAUGSTAD, A.J. MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, v.30, p.1564–1576, 2010.

SCHMITZ, B.; ROLFES, F.; SCHELLECKES, K.; MEWES, M.; THORWESTEN L.; KRÜGER, M.; KLOSE, A.; BRAND, S.M. Longer Work/Rest Intervals During High-Intensity Interval Training (HIIT) Lead to Elevated Levels of miR-222 and miR-29c. *Front Physiol.* Apr 17;9:395. 2018.

SILVA, C.I.; NOVAIS, P.C.; RODRIGUES, A.R.; CARVALHO, C.A.; COLLI, B.O.; CARLOTTI, C.G. JR; TIRAPELLI, L.F.; TIRAPELLI, D.P. Expression of NMDA receptor and microRNA-219 in rats submitted to cerebral ischemia associated with alcoholism. *Arq Neuropsiquiatr.* Jan;75(1):30-35. 2017.

SILVA, M.P.; MARCONDES, M.C.C.G.; MELLO, M.A.R. Exercício aeróbio e anaeróbio: efeitos sobre a gordura sérica e tecidual de ratos alimentados com dieta hiperlipídica. *Revista Brasileira de Atividade Física e Saúde*, Londrina, v.4, n.3, p.4356, 1999.

STRADECKI-COHAN, H. M. et al. Physical Exercise Improves Cognitive Outcomes in 2 Models of Transient Cerebral Ischemia. *Stroke*, v. 48, n. 8, p. 2306–2309, ago. 2017.

STUMMER, W.; BAETHMANN. A.; MURR, R.; SCHURER, L.; KEMPSKI, O.S. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil for brain ischemic. *Stroke*, v.25, p.1862- 1869, 1995.

SWEENEY, M.I.; YAGER, J.Y.; WIAZ, W.; JUURLINK, B.H.J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Can J Physiol Phamacol*, v. 73, p. 1525-1535, 1995.

TAMURA, A.; GRAHAM, D.I.; MCCULLOCH, J.; TEASDALE, G.M. Focal cerebral ischemia in the rat. I: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Jornal Cerebral Blood Flow Metabolism*, v. 1, p. 53-60, 1981.

TIRAPELLI, L. F. Morphological changes in the lateral ventricles choroid plexus of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to the experimental chronic alcoholism. *Arq Neuropsiquiatr.*, v. 57, n. 4, p.1060-1061, 1999.

TIRAPELLI, L.F.; TAMEGA, O.J.; PETRONI, S. Ultrastructural alterations of choroid plexuses of lateral ventricles of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Arq Neuropsiquiatr.*, v. 58, n. 1, p. 25-31, 2000.

ULTIMO, S.; ZAULI, G.; MARTELLI, A.M.; VITALE, M.; MCCUBREY, J.A.; CAPITANI, S.; NERI, L.M. Influence of physical exercise on microRNAs in skeletal muscle regeneration, aging and diseases. *Oncotarget*. Mar 30;9(24):17220-17237. 2018.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. Psychological Bulletin ,v . 83, p.482 -304, 1976

WESTERMAIER, T.; ZAUSINGER, S.; BAETHMANN, A.; STEIGER, H.; SCHMID-ELSAESSER, R. No additional neuroprotection provided by barbiturate-induced burst suppression under mild hypothermic conditions in rats subjected to reversible ischemia. J Neurosurg, v.93, p. 835-884, 2000.

WILMORE, J.H.; COSUL, D.L. Fisiologia do esporte e do exercício. 2ª editora, Ed.Manuel, São Paulo, 2001.

YAMADA, K.; YU, B.; GALLAGHER, J.P. Different subtypes of GABA_B receptors are present at pre and postsynaptic sites within the rat dorsolateral septal nucleus. J. Neurophysiol., v. 81(6), p. 2875-2883, 1999.

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

ZHENG, H.; TANG, R.; YAO, Y.; JI, Z.; CAO, Y.; LIU, Z.; PENG, F.; WANG, W.; CAN, D.; XING, H.; BU, G.; XU, H.; ZHANG, Y.W.; ZHENG, W. MiR-219 Protects Against Seizure in the Kainic Acid Model of Epilepsy. Mol Neurobiol.

Jan;53(1):1-7. 2016.