



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITO NEUROPROTETOR DE  
DIFERENTES PROGRAMAS DE EXERCÍCIO  
FÍSICO REGULAR FORÇADO EM MODELO DE  
ISQUEMIA *in vitro***

**Fernanda Cechetti**

Porto Alegre

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITO NEUROPROTETOR DE DIFERENTES PROGRAMAS  
DE EXERCÍCIO FÍSICO REGULAR FORÇADO EM MODELO DE  
ISQUEMIA *in vitro***

Fernanda Cechetti

**Orientador:** Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Ionara Rodrigues Siqueira

Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul como requisito parcial para  
obtenção do título de mestre em  
Neurociências.

Porto Alegre

2007

*aos meus pais*  
*Dorremi Cechetti e*  
*Teresa Foppa...*

*“E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais”.*

**Sheakespeare**

*“Preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é desperdiçar a oportunidade de merecer”.*

**Luiz Fernando Veríssimo**

## AGRADECIMENTOS

À toda minha família, mesmo que tão longe, sempre senti o apoio e a confiança bem pertinho de mim. Obrigada pelo incentivo.

Ao meu grande amor, ou melhor, meu Mimo... é nessas horas que a gente tem certeza que está com a pessoa certa...obrigada pela ajuda e companheirismo em todos os sentidos.

À UFRGS, ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e a todos os professores pela grande oportunidade.

Obrigada Alex, pela confiança e oportunidade desde o primeiro dia; pela tranquilidade e conforto que passa através das atitudes e palavras certas nas horas certas.

Ionara, ou melhor Io, obrigada! Obrigada por tudo, pelo tempo dedicado, paciência, dedicação, aprendizado e acima de tudo amizade....Valeu !!!

Minha querida e quebra-galhos Lenir. Minha salvadora em vários momentos, desde o primeiro dia. Obrigada pela sua dedicação e disponibilidade em todos os momentos; isso é só uma das qualidades da pessoa maravilhosa que tu és.

Aos colegas e professores responsáveis do Laboratório de Fisiologia, S100 e Neuroproteção da UFRGS, pelas contribuições e amizades.

À todos os colegas do Lab 32 (saudades)que agora é 11, sem exceções. Pela ajuda e disponibilidade nas horas mais inesperadas. Obrigada!

À empresa ProviverFisio na qual trabalho há quase 4 anos. Sem a força, o apoio e a compreensão nos momentos mais apurados e difíceis, não teria chegado lá. Nunca vou esquecer da amizade.

À todas as colegas “aquáticas” que tive neste período, obrigada pela ajuda e compreensão. Vocês seguraram a barra direitinho...valeu!!!

A todos, que de alguma maneira, contribuíram para minha formação e para que este trabalho se tornasse realidade.

## SUMÁRIO

Abreviaturas.....	7
Lista de Figuras.....	9
Resumo.....	11
<b>1. Introdução.....</b>	<b>12</b>
1.1 Exercício.....	13
1.1.1 Exercício e Função Cerebral.....	14
1.1.2 Modelos de Exercício Físico.....	17
1.2 Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo – BDNF.....	20
1.2.1 Exercício e BDNF.....	21
1.3 Isquemia Cerebral.....	23
1.3.1 Alterações Fisiopatológicas nas Isquemia Cerebral.....	26
1.3.2 Exercício e Isquemia Cerebral.....	28
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>30</b>
2.1 Objetivo Geral.....	31
2.2. Objetivos Específicos.....	31
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>32</b>
3.1 Animais.....	33
3.2 Desenho Experimental.....	33
3.2.1 Artigo 1.....	33
3.2.2 Artigo 2.....	34
3.3 Protocolo de Treinamento.....	35
3.4 Dissecção e Preparação das estruturas.....	35
3.5 Evento Isquêmico in vitro (POG) – Artigo 1.....	36
3.5.1 Viabilidade Celular (Atividade Mitocondrial).....	36
3.5.2 Dano Celular (Lise Celular).....	37
3.6 Quantificação do BDNF – Artigo 2.....	37

3.7 Análise Estatística.....	37
<b>4. Resultados.....</b>	<b>38</b>
4.1 Artigo 1.....	39
4.2 Artigo 2.....	58
4.3 Efeito do Exercício físico sobre os níveis de BDNF.....	84
<b>5. Discussão.....</b>	<b>85</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>94</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>96</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>116</b>
Anexo A.....	117
Anexo B.....	118

## ABREVIATURAS

<b>AEBSF</b>	Amino-etil-benzeno-sulfanil
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>AVC</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>BDNF</b>	Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo
<b>CA1</b>	Subcampo 1 do corno de Ammon, segundo nomenclatura de Lorent Nó
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	Íon cálcio
<b>CB</b>	Cerebelo
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CTX</b>	Córtex cerebral
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ERO</b>	Espécie reativa de oxigênio
<b>EXE</b>	Exercitado
<b>EXEPOG</b>	Exercitado submetido a privação de oxigênio e glicose
<b>EXENPOG</b>	Exercitado não submetido a privação de oxigênio e glicose
<b>H<sup>+</sup></b>	Íon hidrogênio
<b>HC</b>	Hipocampo
<b>icv</b>	Intra-cérebro-ventricular
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>MTT</b>	3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazólio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido



<b>NPOG</b>	Não submetido à privação de oxigênio e glicose
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	Radical superóxido
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radical Hidroxila
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>POG</b>	Privação de Oxigênio e Glicose
<b>PMSF</b>	Fenil Metil Sulfonil Fluoreto
<b>SED</b>	Sedentário
<b>SEDPOG</b>	Sedentário submetido a privação de oxigênio e glicose
<b>SEDNPOG</b>	Sedentário não submetido a privação de oxigênio e glicose
<b>STR</b>	Estriado
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TrK</b>	Receptores tirosina-cinases
<b>VO<sub>2</sub></b>	Volume máximo de oxigênio

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Fotografias da esteira ergométrica utilizada para a prática de exercício físico forçado (corrida) em ratos .....**19**
- FIGURA 2.** Efeito do exercício físico em esteira durante 20 min (uma e três vezes por semana, durante 3 meses) sobre a viabilidade celular (atividade mitocondrial), usando o MTT, em fatias hipocâmpais de ratos expostos a POG (privação de oxigênio e glicose) e reoxigenação .....**53**
- FIGURA 3.** Efeito do exercício físico em esteira durante 20 min (3 semanas, duas vezes ao dia) sobre a viabilidade celular (atividade mitocondrial), usando o MTT, em fatias hipocâmpais de ratos expostos a POG (privação de oxigênio e glicose) e reoxigenação .....**54**
- FIGURA 4.** Efeito do exercício físico em esteira durante 20 min (uma e três vezes por semana, durante 3 meses) sobre a injúria celular, quantificada pela liberação de LDH, em fatias hipocâmpais de ratos expostos a POG e reoxigenação.....**55**
- FIGURA 5.** Efeito do exercício físico em esteira durante 20 min (3 semanas, duas vezes ao dia) sobre a injúria celular, quantificada pela liberação de LDH, em fatias hipocâmpais de ratos expostos a POG e reoxigenação.....**56**
- FIGURA 6.** Diferença entre a condição de privação de oxigênio e glicose (POG) e a condição controle (NPOG) (realizado com 100%).....**57**

**FIGURA 7.** Quantificação dos níveis de BDNF (2º Trabalho) em diferentes áreas cerebrais do grupo exercitado (EXE) e sedentários (SED): hipocampo, córtex, estriado e cerebelo.....**83**

**FIGURA 8.** Quantificação dos níveis de BDNF (1º Trabalho) hipocampal de ratos sujeitos a 3 meses de treinamento, com frequência de 1 e 3 vezes por semana em esteira motorizada.....**84**

## RESUMO

Evidências sugerem que o exercício físico pode ajudar a manter a saúde cerebral e suas funções. Os mecanismos moleculares pelos quais o exercício afeta a função cerebral ainda não estão estabelecidos, porém sugere-se que ocorra ativação de vias celulares e moleculares que contribuam a neuroproteção. Nosso objetivo foi avaliar o efeito do exercício físico regular moderado em diferentes frequências/intensidades sobre a integridade hipocampal após uma injúria isquêmica *in vitro*, e investigar seu possível mecanismo de neuroproteção através da quantificação do BDNF. O trabalho foi dividido em duas etapas. No primeiro trabalho um grupo de animais foi treinado durante 3 semanas, 2 vezes ao dia e outro grupo treinado cronicamente (12 semanas, durante 20 minutos), contudo com diferentes frequências na realização da atividade física, que ocorreram 1 ou 3 vezes por semana. O grupo sedentário foi submetido à esteira sem movimento durante 3 minutos. Os animais foram decapitados cerca de 16 horas após a última sessão de treino. Os cérebros foram dissecados, o hipocampo imediatamente fatiado em “chopper” e as fatias randomizadas em duas placas controle (NPOG) e privada de oxigênio e glicose (POG). Após 3 h de reoxigenação, foram realizados os ensaios de avaliação da viabilidade celular, através da atividade mitocondrial, e de lise celular, pela determinação da liberação da enzima citosólica lactato desidrogenase. A POG significativamente reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 40%, mas não houve diferença entre os grupos exercitados e o grupo sedentário. A POG aumentou a lise celular, não havendo diferença significativa entre o grupo sedentário e os exercitados uma vez por semana. Por outro lado, o exercício realizado 3 vezes por semana reverteu parcialmente o aumento do dano celular causado pela isquemia.

No segundo trabalho, o hipocampo não utilizado para o ensaio da POG, foi utilizado para a quantificação do BDNF (Kit ELISA - BDNF Emax® ImmunoAssay System), a fim de relacionar o possível mecanismo de ação deste protocolo. Também, realizamos outro tipo de treino com diferente frequência (2 semanas, com treinos diários de 20 minutos), o qual já demonstrou seu efeito neuroprotetor em outro trabalho realizado em nosso laboratório (Scopel et al., 2006), portanto, também realizamos o ensaio do BDNF neste protocolo nas estruturas: hipocampo, estriado, córtex e cerebelo. Surpreendentemente, tanto o exercício realizado cronicamente (1 e 3 vezes por semana), quanto o realizado diariamente durante 2 semanas, não alteraram os níveis de BDNF. Corroborando achados da literatura, o BDNF está presente em altas concentrações no hipocampo quando comparados a outras estruturas estudadas. Nossos dados demonstram que as células hipocampais frente ao exercício moderado apresentam baixa susceptibilidade ao dano isquêmico, e que o exercício com intensidade moderada realizado três vezes por semana reduz o dano produzido pela isquemia *in vitro*. Em relação ao possível mecanismo de ação envolvido neste processo, nossos dados sugerem que possivelmente o BDNF não está diretamente envolvido com o efeito neuroprotetor deste protocolo.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Exercício

Há 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 disfunções relacionadas ao estilo de vida (RADAK *et al.*, 2006). Também contribui para a redução da incidência de tumores (MAHABIR *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2003) e para diminuir o risco de acidentes vasculares cerebrais (AVCs), bem como a mortalidade induzida por AVCs (LEE e PAFFENBARGER, 1998).

Sabe-se que o efeito do exercício físico sobre as variáveis fisiológicas, como atividade cardíaca, pressão arterial, frequência respiratória, temperatura e atividade muscular, pode estar relacionado com um organismo saudável. Sendo assim, as manifestações de adaptação ao exercício são frequentemente utilizadas como parâmetro de avaliação da capacidade funcional do organismo. Portanto, o exercício pode ser considerado um dos fatores que promovem um estilo de vida mais saudável (WILMORE e COSTILL, 2001).

O exercício fornece benefícios psicológicos, proporcionando integração social e melhorando a auto-estima, agindo na melhora do bem estar de uma maneira geral. Os efeitos relatados incluem ação ansiolítica e antidepressiva, melhor resistência a problemas emocionais e fisiológicos oriundos de estresses psicológicos. O efeito psicológico benéfico do exercício tem sido confirmado em pacientes com depressão leve a moderada (DUMAN, 2005).

### 1.1.1. Exercício e Função Cerebral

Muitos estudos sugerem que o exercício melhora a função cerebral, porém há um conhecimento restrito sobre o seu mecanismo de ação. Tem sido proposto que o exercício mantém a integridade cerebrovascular (MC FARLAND, 1963), promove a capilarização (BLACK *et al.*, 1987) e aumenta as conexões sinápticas (PYSH e WEISS, 1979). Após um programa de exercícios voluntários em camundongos adultos, VAN PRAAG e colaboradores (1999) observaram que, além de melhorar o aprendizado espacial, o exercício aumenta a neurogênese no giro denteado de maneira similar ao enriquecimento ambiental.

Alguns trabalhos apresentam o efeito do exercício físico sobre a função cognitiva (MCCLOSKEY *et al.*, 2001). Em modelos comportamentais de memória espacial relacionados ao hipocampo em roedores, o exercício demonstrou uma melhora na memória e no aprendizado. No labirinto aquático, onde os roedores precisam encontrar uma plataforma submersa utilizando dicas espaciais, ratos e camundongos exercitados gastam uma proporção maior de tempo no quadrante da plataforma de escape, porém com velocidade de nado igual aos controles (MCCLOSKEY *et al.*, 2001).

O melhor condicionamento físico e a resposta ao estresse são considerados fatores potenciais de confusão porque a natação é um efetivo estressor e requer grande esforço físico. Entretanto, os resultados foram reproduzidos por ANDERSON *et al.*, (2000) utilizando o labirinto radial de oito

braços, no qual os ratos exercitados de forma voluntária em rodas de corrida durante sete semanas necessitaram 30% menos treinos para adquirir o critério de desempenho, mas com média de tempo gasto igual aos controles sedentários. RADAK *et al.* (2001), em estudo com roedores submetidos à natação demonstraram que exercício regular pode ser um meio importante para prevenir o declínio da função cognitiva relacionada com a idade. Segundo RAMSDEN *et al.* (2003), a atividade física regular causa aumento do aprendizado espacial, ganho significativo na memória e diminuição do declínio da atividade espontânea relacionados com a idade em roedores.

Frente a todos esses dados, o exercício regular parece ser significativamente benéfico à saúde. (RADAK *et al.*, 2001). Atualmente, o exercício físico tem sido encarado como um instrumento, tanto preventivo como terapêutico, para vários tipos de doenças (WILMORE e COSTILL, 2001).

É importante ressaltar que vários estudos epidemiológicos demonstram que o exercício físico pode contribuir para a diminuição dos riscos de acidentes vasculares cerebrais, além da mortalidade induzida por AVCs (LEE e PAFFENBARGER, 1998). STUMMER *et al.* (1994), relataram que o exercício pré-isquêmico tem propriedades neuroprotetoras. O livre acesso de gerbilos a uma roda de corrida durante 14 dias antes da indução da isquemia global (15 e 20 minutos) resultou em um aumento na sobrevivência (90% de animais exercitados comparados a 44% de animais controles). A análise histológica quantitativa



mostrou que o dano foi atenuado no hipocampo, neocórtex, estriado e tálamo em animais exercitados.

Recentemente, resultados obtidos em nosso laboratório demonstram que o exercício físico causa, de maneira dependente da intensidade, alterações na susceptibilidade hipocampal ao dano isquêmico *in vitro*. O exercício moderado parece proteger células hipocampais do dano isquêmico, já que reduziu o dano celular induzido pela isquemia-reoxigenação *in vitro* em fatias hipocampais de ratos (SCOPEL *et al.*, 2006). Os dados sugerem que o mecanismo de ação de neuroproteção pelo exercício moderado seja independente da melhora do estado oxidativo celular, pois seus hipocampus não apresentaram alterações nos parâmetros de índice de estresse oxidativo avaliados. Possivelmente, a proteção provém de alteração da expressão gênica, por exemplo, de neurotrofinas, especialmente do fator neurotrófico derivado do encéfalo (“brain-derived neurotrophic factor”, BDNF). Paradoxalmente, o exercício intenso parece potencializar o dano isquêmico, pois aumentou significativamente o dano celular produzido pela isquemia-reoxigenação *in vitro*. Este achado pode estar relacionado a uma ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal com conseqüente hipersecreção de corticosterona, o que pode levar à perda de neurônios hipocampais (SAPOLSKY *et al.*, 1990).

### 1.1.2. Modelos de Exercício Físico

Os autores classificam o treinamento dos animais, conforme a frequência e a intensidade do exercício físico, em: leve, moderado ou intenso. ICHIKAWA e colaboradores (2000) submeteram ratos a um programa de treinamento leve, a fim de mimetizar, experimentalmente, a atividade física normal no cotidiano em humanos, enquanto que um aumento na intensidade do exercício (tempo e potência) submete os animais a um treinamento moderado. A atividade física extenuante (alta intensidade) tem sido classificada como exercício intenso (CHENNAOUI *et al.*, 2001).

Dependendo do período de realização do exercício físico, o mesmo pode ser classificado em agudo ou crônico. Uma questão importante nos estudos que defendem o potencial terapêutico do exercício é se a atividade realizada num curto período de tempo tem o mesmo efeito benéfico daquele realizado a longo prazo (GÓMEZ-PINILLA, 2002). OGONOVSKY (2005) cita que os efeitos produzidos pelo exercício regular crônico podem ser muito diferentes dos efeitos do exercício agudo; muitas vezes até opostos, já que as adaptações induzidas pelo exercício físico dependem diretamente do estímulo aplicado.

Outra classificação aplicada ao exercício é relacionada à motivação: forçada ou voluntária. O protocolo de treinamento forçado consiste em sessões de corrida em esteira ergométrica ou o nado forçado (RADÁK *et al.*, 2001; RA *et al.*, 2002). Recentemente, a corrida realizada em esteira tem se mostrado efetiva na

promoção de uma atividade rítmica e também como um método de treinamento tanto crônico quanto aguda após uma isquemia cerebral (YANG *et al.*, 2002). Animais com livre acesso a uma roda de corrida podem realizar o exercício físico voluntariamente durante semanas ou meses (MONDON *et al.*, 1985; RUSSEL *et al.*, 1987). Surpreendentemente, muitos estudos estão sendo aplicados nesta área, mas os reais efeitos causados pelo exercício forçado ou voluntário ainda não estão bem claros (OGONOVSKY *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Fotografias da esteira ergométrica utilizada para a prática de exercício físico forçado (corrida) em ratos (conforme descrito em RADÁK *et al.*, 2001).

## **1.2. Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo - BDNF**

Segundo RADAK *et al.* (2005), as neurotrofinas de uma forma geral provocam mudanças fisiológicas e estruturais, e regulam a expressão gênica nos neurônios. Dentre elas, existem basicamente duas que exercem um papel crucial na função cerebral relacionada ao exercício físico: o BDNF (Fator Neurotrófico derivado do encéfalo, do inglês - Brain-derived neurotrophic factor) e o NGF (Fator de crescimento Neuronal, do inglês - Nerve growth factor).

O BDNF interage com alta afinidade com os receptores do tipo tirosinacinasas (Trk) e sua expressão é regulada pela atividade neuronal e por hormônios periféricos. É a neurotrofina que se encontra mais distribuída no encéfalo e tem sido citado como importante regulador da plasticidade sináptica (CALLAGHAN *et al.*, 2006). Os fatores tróficos são implicados na regulação da sobrevivência e diferenciação de neurônios durante o desenvolvimento, mas várias evidências indicam que eles também estão implicados em várias funções na idade adulta, inclusive em processos de plasticidade (ARANCIBIA *et al.*, 2004).

Vários relatos demonstram também que esta proteína está implicada nos processos de neurogênese. Por exemplo, viver em um ambiente enriquecido aumenta o número de novas células geradas no hipocampo (ICKES e tal., 2000) e também a expressão de mRNA do BDNF (Garza *et al.*, 2004). Diminuições na expressão de BDNF em certas regiões do cérebro estão associadas com atrofia ou morte neuronal, por exemplo, em algumas distúrbios neurológicas. Por

exemplo, a expressão de BDNF diminui no hipocampo ou na substância negra em pacientes com a Doença de Alzheimer ou Parkinson, respectivamente (ARANCIBIA *et al.*, 2004).

### **1.2.1. Exercício e BDNF**

Há vários relatos de aumento na expressão gênica de neurotrofinas, especialmente do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), induzido pelo exercício físico (NEEPER *et al.*, 1996; JOHNSON & MITCHELL, 2003). Estudos prévios demonstraram que o BDNF promove proliferação e/ou sobrevivência de vários tipos de neurônios, como os neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (KNÜSEL *et al.*, 1991), neurônios GABAérgicos estriatais (VENTIMIGLIA *et al.*, 1995) e neurônios colinérgicos do prosencéfalo (núcleos basal, septal) (NONNER *et al.*, 1996). É interessante comentar que o receptor de BDNF é um receptor tirosina-cinase, trkB, e a ligação ao receptor desencadeia atividade numa série de vias de sinalização intracelular promotoras de crescimento e sobrevivência, como as cascatas Ras/MAP cinase e fosfatidilinositol-3 cinase/Akt (YUAN & YANKNER, 2000).

Evidências recentes têm sugerido que comportamentos diários e o estilo de vida, como o exercício físico e o ambiente enriquecido, dois fatores associados também à saúde emocional (ICKES *et al.*, 2000, NEEPER *et al.*, 1995), aumentam os níveis de BDNF no cérebro (GARZA *et al.*, 2004). A infusão direta de BDNF no

mesencéfalo produz um efeito semelhante à administração de antidepressivos em modelos comportamentais, nos paradigmas do desamparo aprendido e do nado forçado (SHIRAYAMA *et al.*, 2002; SIUCIAK *et al.*, 1997). Este efeito pode estar relacionado às ações ansiolíticas e antidepressivas do exercício físico descritas por indivíduos em geral e pacientes com problemas emocionais (SALMON, 2001).

KIPRIANOVA e colaboradores (1999) demonstraram que a administração intracerebroventricular (icv) de BDNF apresentou efeito neuroprotetor da transmissão sináptica e de funções cognitivas em modelo de isquemia cerebral global transitória. Também demonstrando que o BDNF tem efeito protetor em eventos isquêmicos, a injeção de BDNF (icv) antes da injúria hipóxica-isquêmica reverteu a ativação de caspase-3; as caspases são proteases envolvidas na morte celular programada (HAN *et al.*, 2000).

É interessante reportar que um curto período de treinamento aumenta a expressão de BDNF. RUSSO-NEUSTADT e colaboradores (1999, 2000) demonstraram que dois, sete ou vinte dias de exercício voluntário aumentaram o conteúdo de RNAm de BDNF hipocampal.

Porém, sabe-se que o BDNF hipocampal é reduzido em resposta ao estresse (SMITH *et al.*, 1995). A natação forçada em água fria sem escape, que induz estresse nos animais, reduz a expressão do BDNF hipocampal (SMITH *et al.*, 1996).

### **1.3. Isquemia Cerebral**

A isquemia cerebral é uma das principais causas de morte no Brasil, segundo Sociedade Brasileira de Neurologia, (2000). Existem vários fatores de risco importantes para a isquemia cerebral, dentre eles estão a hipertensão arterial, o fumo, a inatividade física, a obesidade e a dieta (BRONNER *et al.*, 1995). GILLUM e INGRAM (1996) demonstraram que o comportamento sedentário está relacionado com o maior risco para o AVC (acidente vascular cerebral).

Danos isquêmicos cerebrais, produzidos por acidentes vasculares cerebrais ou infarto do miocárdio, são uma das maiores causas de incapacidade neurológica. A isquemia global transitória ocorre nos casos de parada cardíaca ou isquemia coronária severa, enquanto a isquemia focal ocorre nos casos de AVC trombóticos ou hemorrágicos (MELDRUM, 1990).

A isquemia cerebral é caracterizada por uma redução significativa ou pela interrupção total do aporte sanguíneo (SIESJÖ, 1978). O cérebro é particularmente vulnerável ao dano isquêmico, devido à alta taxa metabólica e a uma restrita reserva energética. Insultos isquêmicos ao tecido cerebral causam disfunção neuronal e podem levar à morte celular (MELDRUM, 1990).

Diferentes populações neuronais apresentam distinta susceptibilidade ao dano induzido por eventos isquêmicos. Danos isquêmicos do tipo vulnerabilidade seletiva em hipocampo são amplamente usados para analisar mecanismos



básicos do dano neuronal e avaliar o efeito de fármacos terapêuticos (SCHMIDT-KASTNER e FREUND, 1991).

Em modelos experimentais, a isquemia pode ser realizada tanto *in vivo* como *in vitro*. No primeiro, a isquemia global pode ser produzida experimentalmente pela oclusão temporária das artérias carótidas comuns (SMITH *et al.*, 1984), ou pela oclusão permanente das artérias vertebrais seguida da oclusão transitória das carótidas comuns (PULSINELLI & BRIERLEY, 1979). Acidentes vasculares cerebrais são geralmente produzidos experimentalmente pela oclusão irreversível da artéria cerebral média em roedores, gatos, cães e primatas (SMITH *et al.*, 1984).

Episódios agudos de anóxia cerebral causada por parada cardíaca ou acidentes vasculares cerebrais podem induzir síndromes amnésicas; estes quadros estão associados a lesões, sobretudo na região CA1 do hipocampo (VOLPE *et al.*, 1985; SCHMIDT-KASTNER e FREUND, 1991). A isquemia global induzida por oclusão das artérias vertebrais e/ou carótidas em ratos produz lesões hipocampais que estão associadas a déficits de memória e aprendizagem. Ratos Wistar submetidos à isquemia global transitória através da cauterização permanente das artérias vertebrais e 20 minutos de oclusão das carótidas comuns apresentam desempenho prejudicado nas tarefas de esquiva ativa e esquiva inibitória quando testados entre 21 a 28 dias após o insulto isquêmico (NETTO *et al.*, 1995). Animais submetidos a episódios de 15 e 20 minutos de isquemia (oclusão dos quatro vasos) apresentaram perda de células piramidais do CA1,

além de déficit no desempenho em tarefas espaciais no labirinto aquático de Morris (NUNN *et al.*, 1991; NETTO *et al.*, 1993a).

Em adição, há relatos de que após o infarto do miocárdio e a consequente isquemia cerebral os pacientes apresentam, além de déficits de memória, dificuldade de atenção e/ou alteração no humor. A fim de estudar o efeito da isquemia global sobre alterações emocionais em modelos animais, DHOOPER *et al.* (1997) testou ratos machos Long-Evans sujeitos a 7 minutos de compressão cardíaca, para reproduzir uma parada cardíaca e isquemia global, num modelo de avaliação de ansiedade, o labirinto em cruz elevado. Os ratos isquêmicos gastaram menos tempo nos braços abertos (3% da razão: tempo braços abertos/tempo braços abertos + tempo nos braços fechados) do que ratos manipulados (54%) e operados “sham” (30%), sendo estes resultados interpretados como aumento da ansiedade. Os efeitos da atividade física, amplamente descritos, incluem ações tipo ansiolítica e antidepressiva, e resistência a estresses psicológicos, demonstrando seu potencial valor como uma forma de melhora do bem estar. SALMON (2001) sugere que o exercício pode ser usado especialmente no tratamento de pacientes com problemas emocionais que rejeitam ostensivamente diagnósticos psicológicos e respectivos tratamentos.

Na isquemia produzida *in vitro*, uma alternativa é o uso de cultivo de células ou de tecidos em estudos de processos neurodegenerativos (NEWELL *et al.*, 1993). Com o intuito de mimetizar um evento isquêmico tem-se utilizado a privação de oxigênio e glicose (POG) ao submergir fatias de tecidos em meio livre

de glicose numa incubadora com atmosfera anaeróbica (BARTH *et al.*, 1996; LAAKE *et al.*, 1999). O uso de fatias hipocampais é particularmente interessante, desde que boa parte da organização celular, células inflamatórias e conexões intercelulares são preservadas (COHEN *et al.*, 1984; TAYLOR *et al.*, 1995). Adicionalmente, a POG é um método relativamente simples e reproduz aspectos importantes da isquemia *in vivo*, como a vulnerabilidade seletiva das células da região CA1 (TAVARES *et al.*, 2001).

### **1.3.1. Alterações Fisiopatológicas na Isquemia Cerebral**

São inúmeras as alterações fisiopatológicas desencadeadas pela isquemia cerebral. A interrupção do fluxo sanguíneo promove uma redução dos níveis de oxigênio, ocasionando a interrupção da fosforilação oxidativa. Sendo assim, a glicólise anaeróbica passa a ser a fonte de adenosina trifosfato (ATP), conseqüentemente, o acúmulo de lactato, íons hidrogênio ( $H^+$ ) e o aumento de  $CO_2$ , resultam em acidose, podendo o pH do tecido chegar próximo de 6,0 (FUNAHASHI *et al.*, 1994). Contudo esta fonte energética é insuficiente para as necessidades das células cerebrais. A depleção de ATP reduz o funcionamento das atividades dependentes de energia, como por exemplo, as bombas iônicas, o que ocorre em cerca de 4 minutos. A redução da funcionalidade da bomba de  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase resulta na perda dos gradientes iônicos transmembrana, o que leva a despolarização da membrana e, conseqüentemente, à abertura de canais iônicos

voltagem-dependentes. O  $\text{Ca}^{2+}$ , ao entrar na célula, estimula a liberação de neurotransmissores das vesículas, como o glutamato (DUGAN e CHOI, 1999).

Existem várias evidências de que o processo final de injúria neuronal isquêmica seja o aumento da formação de radicais livres (BRAUGLER e HALL, 1989; SIESJO *et al.*, 1989).

Durante a isquemia o ATP é depletado e não pode ser ressintetizado com a interrupção da fosforilação oxidativa, sendo assim, ocorre o acúmulo dos seus metabólitos adenosina, inosina e hipoxantina. Além disso, proteases celulares são ativadas devido ao influxo de cálcio. As proteases celulares ativadas convertem a enzima xantina desidrogenase que, em condições normais, transforma hipoxantina em xantina e ácido úrico, em xantina oxidase que, durante a reperfusão, usa o oxigênio molecular como o aceptor de elétrons, produzindo o radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (CAO *et al.*, 1988).

O radical  $\text{O}_2^-$  é o principal radical livre gerado durante a isquemia/reperfusão cerebral, o qual gera o radical hidroxil ( $\text{OH}^-$ ), que, durante a reação de Haber-Weiss, possui um forte potencial de destruição dos tecidos, sendo considerado a espécie reativa de oxigênio (ERO) mais lesiva aos sistemas biológicos.

O influxo de cálcio leva a ativação das fosfolipases, inclusive a fosfolipase A, que gera ácido araquidônico, o qual pode ser metabolizado pelas ciclooxigenases ou lipoxigenases originando a produção de substâncias

vasoativas que são as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano, leucotrienos e radicais livres (CAO *et al.*, 1988).

Outro mecanismo onde os radicais livres estão envolvidos e que pode contribuir para o dano isquêmico é a resposta inflamatória, em que os neutrófilos e a microglia respondem ao dano isquêmico originando radicais livres (MORI *et al.*, 1992).

### **1.3.2. Exercício e Isquemia Cerebral**

O exercício regular parece ser significativamente saudável, melhorando auto-estima e bem-estar, e está associado à diminuição da incidência de certas doenças (RADÁK *et al.*, 2001). Por outro lado, vários estudos relatam que o comportamento sedentário está relacionado com o aumento de risco de AVC (GILLUM e INGRAM, 1996). Mesmo com o conhecimento empírico de que o exercício físico tem efeito protetor em doenças isquêmicas cardíacas e cerebrais, poucos estudos têm examinado os efeitos protetores da atividade física contra as doenças cerebrovasculares.

É comum na prática de centros de reabilitação o uso de tratamento e programas de treinamento para pacientes que sofreram uma isquemia cerebral. Estudos recentes sugerem que a intensidade da manipulação, como a duração, o tipo e o tempo de atividade empregada, podem ter profundos efeitos na recuperação destes indivíduos (YANG *et al.*, 2003).

YANG e colaboradores (2002) propõem que o exercício, quando realizado 24h após uma isquemia cerebral focal, reduz significativamente o volume do dano e melhora a recuperação neurológica em ratos. Entretanto, outros autores indicam que o treinamento precoce intenso pode apresentar um efeito negativo (SACCO *et al.*, 1998).

Resultados interessantes foram descritos por SACCO e colegas (1998). Estes observaram as relações entre os benefícios e o tempo de prática de atividade física. A prática de atividade física mais freqüentemente observada foi a caminhada, que quando praticada moderadamente traz benefícios à saúde.

A corrida motorizada tem-se mostrado neuroprotetora em vários modelos experimentais de injúria isquêmica. Em adição ao aumento da neurogênese no giro denteado de ratos normais, a roda de corrida aumenta a expressão de proteínas envolvidas no tráfego sináptico e vias de transdução de sinal, neurotrofinas e neurotransmissores (PLOUGHMAN *et al.*, 2005).

## **2. OBJETIVOS**

Este estudo tem como base dados epidemiológicos relacionados ao papel do exercício físico na saúde e no bem-estar, em especial como alternativa terapêutica na isquemia cerebral.

A hipótese geral do trabalho é que o exercício físico regular intermitente apresentará atividade neuroprotetora em modelo *in vitro* de isquemia e que esta atividade neuroprotetora estará relacionada ao aumento dos níveis de BDNF.

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do exercício físico regular moderado, em diferentes frequências/intensidades, sobre a integridade hipocampal após uma injúria isquêmica, e investigar seu possível mecanismo de neuroproteção.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1) Avaliar o efeito do exercício físico de diferentes esquemas de treinamento (intensidade e/ou frequência) em esteira ergométrica (corrida) sobre a viabilidade (MTT) e dano celular (LDH) utilizando um modelo de isquemia *in vitro*, a privação de oxigênio e glicose.

2) Determinar o conteúdo de BDNF nos mesmos esquemas de treinamento (intensidade e/ou frequência) em esteira ergométrica (corrida), a fim de relacionar o efeito protetor do exercício com o conteúdo hipocampal de BDNF.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Animais

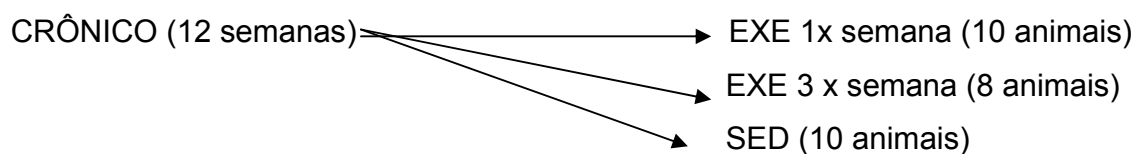
Foram utilizados ratos Wistar adultos machos (com idade entre 60 e 90 dias, pesando de 140 a 230g), provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos em caixas plásticas (270 X 260 X 310 mm), sendo cinco animais em cada uma, onde todos foram submetidos a um ciclo normal claro/escuro (12 horas, estando as luzes apagadas no período da 19 as 7 h), com ração padronizada e água “ad libitum”.

### 3.2. Desenho Experimental

#### 3.2.1. Artigo 1

Foram comparados diferentes esquemas, especificamente diferentes frequências, de treinamento em esteira, considerando que, praticamente, apenas desportistas realizam exercício físico diariamente. Assim, foi avaliado o potencial neuroprotetor do exercício físico com frequências de uma e três vezes (semana) durante 3 meses de treinamento.

Neste esquema de treino, os animais foram treinados cronicamente (12 semanas, durante 20 minutos), contudo com diferentes frequências na realização da atividade física, então os treinos ocorreram 1 ou 3 vezes por semana, com o horário de início aproximadamente 18 h.



Também, outro grupo de animais foi treinado durante 21 dias, com a realização da atividade física duas vezes ao dia.

3 semanas  $\longrightarrow$  2 vezes ao dia

Todos os animais exercitados, independentemente da frequência do exercício, praticaram atividade durante 20 minutos; já os animais do grupo SED foram submetidos à esteira sem movimento durante 3 minutos, acompanhando o período de exercício dos grupos EXE.

### **3.2.2. Artigo 2**

Os animais foram distribuídos nos grupos experimentais: exercitado (EXE) e sedentário (SED). O grupo de animais EXE (n=8) foi submetido a 20 min/diários de atividade física em esteira durante duas semanas. Os animais do grupo SED (n=10) foram sujeitos à esteira sem movimento durante 3 minutos, acompanhando o período de exercício dos grupos EXE.

A quantificação do Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo, realizada através do Kit ELISA - BDNF Emax® ImmunoAssay System, foi realizada utilizando as seguintes estruturas cerebrais: hipocampo, cerebelo, estriado e córtex cerebral, a fim de sugerir o possível mecanismo de ação, já que em trabalhos prévios do laboratório foi detectado neuroproteção em isquemia in vitro neste protocolo. (Scopel et al., 2006).

Além disso, foi também determinado o conteúdo de BDNF, utilizando também o esquema de treinamento citado no 1º trabalho (3 meses, 20 min diários, com os dois grupos de intensidade: 1 ou 3 vezes por semana), com o mesmo objetivo.

### **3.3. Protocolo de Treinamento**

O protocolo de treinamento consistiu em sessões de corrida em esteira ergométrica adaptada para ratos INSIGHT (Figura 1).

Os mecanismos de fadiga aguda durante o exercício envolvem intensidade do consumo de Volume O<sub>2</sub> máximo (VO<sub>2</sub> máx), na qual a atividade é realizada. Assim, para determinar VO<sub>2</sub> máx foi aplicado o teste de esforço máximo adaptado de BROOKS (1978) por RABBO (2001), com intensidade (expressa na velocidade na esteira rolante em m.min<sup>-1</sup>) de aproximadamente 60% da VO<sub>2</sub> máx individual de cada rato.

O teste de VO<sub>2</sub>, tanto no primeiro como no segundo programa de exercício, era realizado novamente na metade do período em que os animais eram submetidos à corrida dentro daquele programa. Assim, a velocidade era ajustada conforme a capacidade daquele grupo de animais.

Nos dois programas de exercício os animais eram submetidos à atividade física entre as 16 e 18 h.

Os animais foram sacrificados por decapitação cerca de 16 horas após a última sessão de exercício. Todos os animais foram sacrificados no mesmo período do dia, entre 9h e 10h30min.

### **3.4. Dissecção e Preparação das Estruturas**

Após a decapitação, os cérebros foram colocados sobre uma placa de Petry com papel filtro sobre gelo e as estruturas de interesse foram dissecadas. Os hipocampos foram dissecados e imediatamente fatiados em “chopper”. Fatias do segundo esquema de treinamento foram utilizadas no ensaio de privação de

oxigênio e glicose. Algumas fatias foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até a realização dos ensaios de quantificação do BDNF.

### **3.5. Evento Isquêmico *in vitro* (privação de oxigênio e glicose) em fatias hipocampais – ARTIGO 1**

As fatias do hipocampo de um mesmo animal foram randomizadas em duas placas controle (NPOG) e sujeitas à privação de oxigênio e glicose (POG).

Assim, os grupos experimentais foram assim distribuídos:

- Animais sedentários (SED): fatias hipocampais não privadas de oxigênio e glicose (SED NPOG) e fatias privadas de oxigênio e glicose (SED POG).

- Animais exercitados (EXE): fatias hipocampais não privadas de oxigênio e glicose (EXE NPOG) e fatias privadas de oxigênio e glicose (EXE POG).

As fatias foram pré-incubadas com meio de incubação a uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 15 minutos. A placa POG então foi colocada em uma câmara anaeróbica durante uma hora (CÁRDENAS et al., 2000; CIMAROSTI et al., 2001; PORCIÚNCULA et al., 2003). Após 3h de reoxigenação, foram realizados os ensaios de avaliação da viabilidade celular e de lise celular.

#### **3.5.1. Viabilidade Celular (Atividade Mitocondrial)**

A viabilidade celular foi determinada através da avaliação da atividade mitocondrial, utilizando o reagente brometo de 3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A succinato desidrogenase mitocondrial de células viáveis reduz o MTT formando produto colorido, que é extraído com dimetilsulfóxido (DMSO), monitorado a 570nm (MOSMANN, 1983).

### **3.5.2. Dano Celular (Lise Celular)**

A Lactato Desidrogenase (LDH) é uma enzima citosólica. Em situações de lise celular esta é extravasada. A atividade de LDH, liberada no meio, foi determinada usando um *Kit* comercial para LDH (método modificado de Whitaker, Doles Reagentes, Goiânia, Brazil) a fim de verificar o dano celular (lise). Este método emprega a reação lactato/piruvato com a geração de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), que reduz a fenazina metossulfato e este o alumínio férrico. O alumínio ferroso então reage com 1,10-fenantrolina, formando um complexo colorido, monitorado espectrofotometricamente (490nm) (KOH e CHOL, 1987).

### **3.6. Quantificação do BDNF – ARTIGO 2**

Esta quantificação do Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo foi realizada através do Kit ELISA - BDNF Emax® ImmunoAssay System, de acordo com as recomendações do protocolo.

### **3.7. Análise Estatística**

Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Tukey, quando indicado. As diferenças foram consideradas significativas quando o resultado da análise estatística apresentar nível de significância  $p < 0,05$ .

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1. Artigo 1**

Efeito do exercício físico em esteira ergométrica sobre a vulnerabilidade celular à isquemia *in vitro* (POG) em fatias hipocâmpais.

Neste esquema de treino, os animais foram treinados cronicamente (12 semanas, durante 20 minutos), contudo com diferentes frequências na realização da atividade física - 1 ou 3 vezes por semana. Também, outro grupo de animais foram treinados durante 3 semanas, 2 vezes ao dia.

OBS: Neste artigo também constam dados de experimentos que foram realizados em paralelo a esta dissertação.



**Submetido ao Brain Research em 29.12.2006**

**Aceito para publicação em 24. 04.2007**

**Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation**

Running head: Exercise and susceptibility to ischemia

Fernanda Cechetti<sup>3</sup>, Amanda Rhod<sup>1</sup>, Fabrício Simão<sup>2</sup>, Katiane Santin<sup>2</sup>,  
Christianne Salbego<sup>2</sup>, Carlos Alexandre Netto<sup>2,3</sup>, Ionara Rodrigues Siqueira<sup>\* 1, 3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Prédio Anexo, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas-Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

16 Pages, 2 Figures

Address correspondence to: Dr. Ionara Rodrigues Siqueira, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 202, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3316 3121; E-mail: [ionara@ufrgs.br](mailto:ionara@ufrgs.br)

### **Abstract**

We evaluated the effects of two levels of daily and intermittent forced exercise intensity in the treadmill over cell vulnerability to *in vitro* ischemia, oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices from Wistar rats. Moderate exercise three times a week decreased lactate dehydrogenase release after oxygen and glucose deprivation. Our data support the hypothesis that moderate intensity physical exercise reduces the injury caused by *in vitro* ischemia.

SECTION: Disease-Related Neuroscience

Theme J: Disorder of the Nervous System

Topic: Ischemia

**Keywords:** exercise; susceptibility to ischemia; oxygen and glucose deprivation; hippocampal slices

## **1. Introduction**

Evidence suggests that exercise may support brain health and function; consistent to that regular physical activity has been indicated as a therapeutic approach to prevent age-related neurodegenerative diseases (Mattson, 2000). However, data concerning exercise effects on cerebral ischemia in humans, as well as in laboratory animals, have been contradictory; it may be possible that the variability on studies outcomes are caused by biases due to the distinct kinds and intensities of physical activities protocols (Ramsden et al., 2003, Risedal et al., 1999).

Physical exercise is associated with lower stroke risk (Håheim et al., 1993, Salonen et al., 1982), although other studies failed to sustain that finding (Ellekjær et al., 1992, Harmsen et al., 1990). Experimental models have demonstrated that exercised gerbils submitted to forebrain ischemia show reduced neuronal damage (Stummer et al., 1994) and the infarct volumes were decreased in exercised rats receiving focal ischemia (Wang et al., 2001). However, there are reports showing that exercise might increase brain damage (Ramsden et al., 2003, Risedal et al., 1999). It is important to note that most experimental animal models of exercise use daily programs, although humans rarely exercise with such frequency; in fact humans generally engage in sporadic physical training, what represents modest levels of physical activity (Folsom et al., 2000). Therefore, it is reasonable to examine the effect of different exercise intensity training, i.e, different running programs, on severity of in vitro ischemic damage.

The pathogenesis of cerebral ischemia/reperfusion has been associated with depletion of cellular energy sources, release of excitatory amino acids, mitochondrial dysfunction, excessive generation of free radicals and damage membrane (Sims and Zaidan, 1995; White et al., 2000).

Rat forebrain slices exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD) have been used to model ischemic events and to investigate mechanisms of cell death and neuroprotection (Moro et al., 1998; Cárdenas et al., 2000). This model offers important advantages because cell composition, such as functional neurons, inflammatory competent cells, locally released effectors and intercellular connections are preserved, allowing the elucidation of meaningful mechanisms of neuronal damage and protection (Newman et al., 1989; Taylor et al., 1995).

In order to investigate the injury caused by OGD, different parameters of cytotoxicity are commonly employed as markers for brain cell damage (Gabryel et al., 2002, Noraberg et al., 1999). The release of lactic dehydrogenase (LDH) into the media is a index of cell damage or lysis; the increase on the leakage of LDH indicates loss of membrane integrity (Koh and Choi, 1987). Also, the conversion of the tetrazolium salt into formazan (MTT) depends on mitochondrial activity, specifically succinate dehydrogenase, to reduce a tetrazolium salt to a colored product (Mosmann, 1983; Shearman et al., 1995).

We have recently demonstrated that a moderate intensity (two-weeks of 20 min/day of treadmill training) reduces the release of LDH caused by OGD to

hippocampal slices from Wistar rats, while higher training intensity (two-weeks of 60 min/day of treadmill training) exacerbates brain damage (Scopel et al., 2006).

In the present work, training protocols were designed to simulate exercise conditions common to humans, with rats running on the treadmill once and three times per week during twelve weeks (moderate intensity training); an intermediate intensity exercise (two times of 20 min/day of treadmill training during 21 days) was also evaluated. The aim of the study was to demonstrate the effect of distinct treadmill exercise protocols on the outcome of in vitro ischemia – OGD - to hippocampal slices, as assessed by LDH released and MTT reduction.

## **2. Results**

OGD significantly reduced cell viability (about 40%), as assessed by the decrease of mitochondrial dehydrogenase activity (MTT reduction) in slices from sedentary rats and those receiving training in both protocols. There were no significant differences between exercised and sedentary groups (Figure 1A; two-way ANOVA: for OGD,  $F_{1,45} = 33.51$ ,  $P < 0.0001$ ; for EXE,  $F_{2,45} = 0.93$ ,  $P = 0.404$ ; EXE \* OGD interaction,  $F_{2,45} = 0.23$ ,  $P = 0.797$ ).

Accordingly, OGD exposure caused an increase of lactate dehydrogenase (LDH) release (Figure 2) into the incubation media, a marker of tissue necrosis, as compared to control non-OGD. A significant effect of exercise was observed without any significant interaction between OGD and training condition (Figure 2A;

two-way ANOVA: for OGD,  $F_{1,59} = 64.87$ ,  $P < 0.0001$ ; for EXE,  $F_{2,59} = 3.70$ ,  $P = 0.031$ ; EXE \* OGD interaction,  $F_{2,59} = 1.48$ ,  $P = 0.237$ ).

To better analyse the exercise effect, data were also expressed as the difference between OGD and control condition of each animal, to account for intrinsic variability.

The reanalysis, plotted as difference of released LDH reveal that the difference was significantly lower in the three times a week exercised group (Figure 2C, ANOVA,  $F_{2,36} = 6.4106$ ,  $p = 0.0042$ ). This reanalysis of MTT data did not reveal any difference ( $p = 0.7901$ ; data not shown).

Surprisingly, three weeks of twice 20 min/day treadmill running did not alter LDH released after OGD condition (Figure 2B).

### **3. Discussion**

Epidemiological studies demonstrate that exercise in humans may retard and/or ameliorate the age-associated functional declines and age-related diseases. Despite the fact that daily exercise is rarely realized by humans, most animal models of exercise utilize daily protocols. Consistent with our previous studies, in the present work we show that one protocol of moderate intensity exercise reduced ischemic injury, as assessed by reduced levels of LDH released after OGD and reoxygenation.

Our results support clinical findings (Lee and Paffenbarger, 1998) of a U-shaped relationship between physical activity and stroke incidence rates, since we

found that one session per week was ineffective, three times per week for twelve weeks and daily at moderate intensity for two weeks (Scopel et al., 2006) reduced brain damage, while a higher intensity (60 min, daily) increased cell vulnerability (Scopel et al., 2006).

Interestingly, several authors have demonstrated that regular moderate-intensity has favorable effects on brain, including neuroprotective properties. For example, exercise on the treadmill for 30 min once a day for 10 days improved memory and reduced the ischemia-induced neuronal cell death in the dentate gyrus from gerbils (Sim et al., 2005). In addition, treadmill running prevents neuronal loss and the damage induced by excitotoxic agents (Carro et al., 2001). These results also corroborate the hypothesis that moderate exercise is neuroprotective, however we can not exclude the effect of the length, nor of the load of training condition. In fact, the three experimental groups had distinct total exercise workloads: 12 sessions, 36 sessions and 42 sessions.

The exposure of hippocampal slices to *in vitro* ischemic condition reduced cell viability. Consistent with our previous studies (Scopel et al., 2006), slices of all groups exposed to OGD show a comparable decline on cellular viability, demonstrating that slices from exercised rats remain viable after OGD as much as those of sedentary ones. The exercise in all intensities tested did not affect the MTT reduction.

Interestingly, forced treadmill training twice a day for 21 days did not change susceptibility to ischemic insult; that protocol might imply a higher physical (42 20-

min sessions) load, as compared to other groups. Considering that physical exercise also acts as a stressor, activating the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Contarteze et al., 2007) and that a high training intensity (two-weeks of 60 min/day of treadmill training) exacerbates brain damage (Scopel et al., 2006), we might suggest that this exercise protocol causes no neuroprotection nor increases damage because of its moderate stress level.

The understanding of molecular mechanisms potentially involved with neuroprotective action of exercise is incomplete. Presented findings suggest that exercise may be involved with necrosis process, since moderate exercise reduced LDH released induced by OGD followed by only 3 hours of reoxygenation. The lysis and release of intracellular contents are involved with necrotic type of death. Although the assay here used is limited, our data do not exclude the possibility of action from exercise on apoptosis processes; it is worth noting that moderate exercise attenuates lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress (Wang and Huang, 2005). It has also been proposed that exercise intensity, and not exercise type, may be related to neuroprotection induced by exercise, since a voluntary exercise regime at excessive levels increased the kainate-induced neuronal loss (Ramsden et al., 2003), then forced treadmill here used was not a potential confounding factor of the exercise model.

Findings suggest that exercise may exert neuroprotective effects help to improve the cellular oxidative status (Radák et al., 2001) and/ or increase neurotrophin levels in the ischemic brain (Oliff et al., 1998). The detailed



mechanism by which exercise reduced OGD-induced LDH released remains a subject for further investigation.

Concluding, presented data demonstrate that hippocampal cells from moderately exercised rats have lower susceptibility to in vitro ischemia-reperfusion damage, as assessed by LDH release. Further studies are required to investigate the mechanism of exercise-induced neuroprotection.

#### **4. Experimental Procedure**

##### **4.1. Animals**

Male Wistar rats aged 2-3 months, maintained under standard conditions (12-h light/ dark, 22 ± 2 °C) with food and water ad libitum, were used. The Animal Care Committee approved all handling and experimental conditions.

##### **4.2. Training**

Rats were habituated with the treadmill apparatus to minimize novelty stress and randomly assigned to different experimental groups (n = 6-12 in each group): nonexercised (sedentary) and exercised during 20 min-sessions on different programs. Animals in non-exercised (sedentary) groups were left on the treadmill for 3 min without any stimulus to run.

The exercise training consisted of running sessions on an adapted motorized rodent treadmill (INSIGHT) at 60% of their maximal oxygen uptake (Brooks and White, 1978). Measurement of oxygen uptake (VO<sub>2</sub>) peak was carried out in all animals indirectly before training considering the exhaustion. Each rat ran

on a treadmill at a low initial speed followed by increases in speed of 5 m/min every 3 min until the point of exhaustion (i.e., failure of the rats to continue running) and the time to fatigue (in min) and workload (in m/min) were taken as indexes of capacity for exercise, that was taken as VO<sub>2</sub> max (Brooks and White, 1978, Arida et al., 1999).

In the first part of the experiment, the effect of two protocols of chronic forced exercise was assessed. Animals were divided into groups: sedentary (SED), one 20 min-, or three 20 min-sessions of treadmill training per week, between 17:00 and 19:00 pm, for 12 weeks.

The animals were adapted to the treadmill by gradually increasing running speed and time, as follows: weeks 1 and 2, at 12 m/min for the first 3 min, 24 m/min for the next 4 min, 36 m/min for the 6 min, 24 m/min for the 4 min and 12 m/min for the last 3 min; weeks 3 to 6, at 24 m/min for the first 4 min, 36 m/min for the next 12 min, and 24 m/min for the last 4 min; weeks 7 to 10, at 24 m/min for the first 2 min, 36 m/min for the next 16 min, and 24 m/min for the last 2 min. By the end, rats were running at 48 m/min, with the first and the last 2 min run at 36 m/min.

In the second part of the experiment, the rats were allowed to run for two 20 min-daily sessions (11:00 and 18:00 h) for 21 days. During the first days, rats were adapted to treadmill by running at 12 m/min for the first 3 min, 24 m/min for the 4 min, 36 m/min for the 6 min, 24 m/min for the 4 min and 12 m/min for the last 3

min. Finally, animals were running at 48 m/min, with the first and the last 4 min run at 24 m/min.

#### **4.3. Slice preparation and oxygen and glucose deprivation (OGD) followed by reoxygenation**

Rats were sacrificed by decapitation at least 16 hours after the last treadmill running. Both hippocampi were quickly dissected out and transverse sections (400  $\mu$ m) prepared using a McIlwain tissue chopper. Slices of hippocampus of each animal were divided in two sets (control condition and in vitro ischemic condition – oxygen and glucose deprivation, OGD), placed into separate 24-well culture plates and preincubated for 15 min in a modified Krebs-Henseleit solution (pre-incubation solution) (mM): 120 NaCl, 2 KCl, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 10 MgSO<sub>4</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 glucose, in a tissue culture incubator at 37°C with 95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>. After pre-incubation, the medium in the control plate was replaced with another modified Krebs-Henseleit solution (KHS incubation solution) (mM): 120 NaCl, 2 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2.6 NaHCO<sub>3</sub>, 1.19 MgSO<sub>4</sub>, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11 glucose (pH 7.4) and incubated for 45 min in a tissue culture incubator at 37°C with 95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>. OGD slices were washed twice with KHS medium without glucose (pH 7.4) and incubated for 60 min (OGD period) at 37°C in an anaerobic chamber saturated with nitrogen. After the OGD period, media from both control and OGD slices were removed and the two groups received KHS with glucose.

Then, the slices were incubated for another 180 min (recovery period) in the culture incubator. Control and OGD experiments were run concomitantly, using

four slices of the same animal in each plate (Cárdenas et al., 2000, Moro et al., 1998).

#### **4.4. Cellular viability**

At the end of the recovery period, cell damage (membrane lyses) and cell viability (mitochondrial activity) assays were performed. Mitochondrial activity was evaluated by the colorimetric MTT [3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma Chemicals) method. Hippocampal slices were incubated for 45 min at 37°C in the presence of MTT ( $45 \pm \text{g/ml}$ ). Active mitochondrial dehydrogenases of living cells cause cleavage and reduction of the soluble yellow MTT dye to the insoluble purple formazan, which was extracted in dimethyl sulfoxide (DMSO); the optical density was measured at 560 nm (Mosmann, 1983).

#### **4.5. Cellular damage**

Cell damage was quantified by measuring LDH released into the medium (Koh and Choi, 1987). After the recovery period, LDH activity was determined using a kit (Doles Reagents, Goiânia, Brazil). Each experiment was normalized by subtracting the background levels of LDH produced from the “no-treatment” wells. LDH efflux was expressed as the LDH activity present in the incubation solution. Data are expressed as U/L, quantified by the use of kit provided calibration factor.

#### **4.6. Data analysis**

The data were analyzed using two-way ANOVA; factors considered were OGD and training condition. Post hoc comparisons were made by the use of Duncan's test. A value of  $P < 0.05$  was considered to be significant. All data are presented as mean ( $\pm$ S.E.M.).

**Acknowledgements.** We gratefully acknowledge financial support by FAPERGS and CNPq.

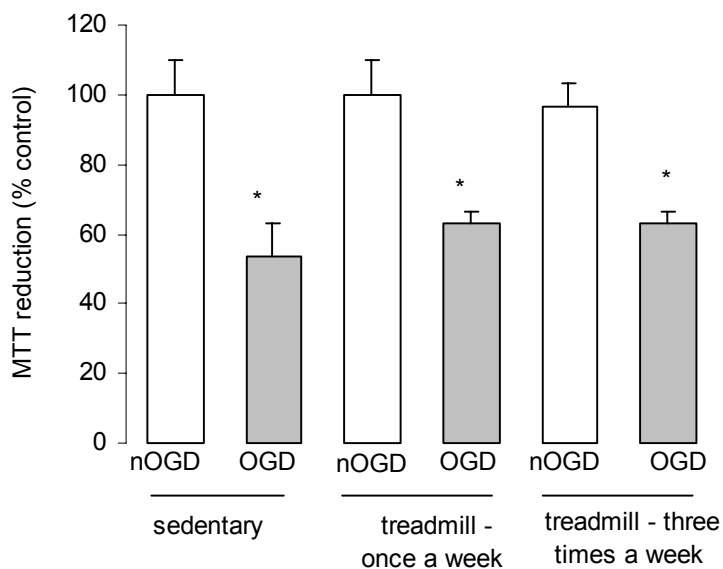
#### **5. References**

Na sessão **7. Referências Bibliográficas**, desta dissertação.

**Figura 2 (referente à dissertação)**

Fig. 1 (artigo 1). Effect of 20 min treadmill exercise (once and three times a week, 12 weeks, panel A - and twice a day, daily, 21 days– panel B) on cell viability (mitochondrial activity), using MTT assay, in hippocampal slices from rats exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD) and reoxygenation. Results are expressed as percentage of the sedentary control, non-OGD (NOGD), group. Columns represent mean  $\pm$  SEM of quadruplicates for seven to twelve experiments. \* values significantly different from those of non-OGD groups, as determined by ANOVA followed by Duncan's test ( $P < 0.05$ ).

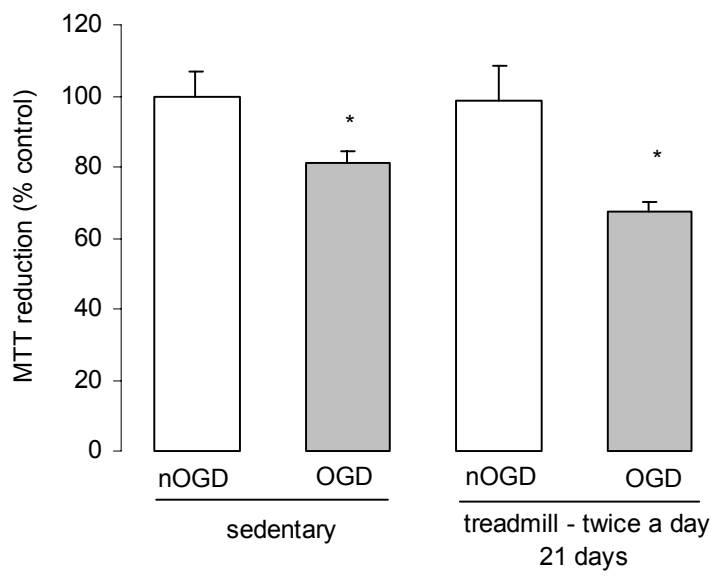
A



**Figura 3 (referente à dissertação)**

Fig. 1 (artigo 1 ).

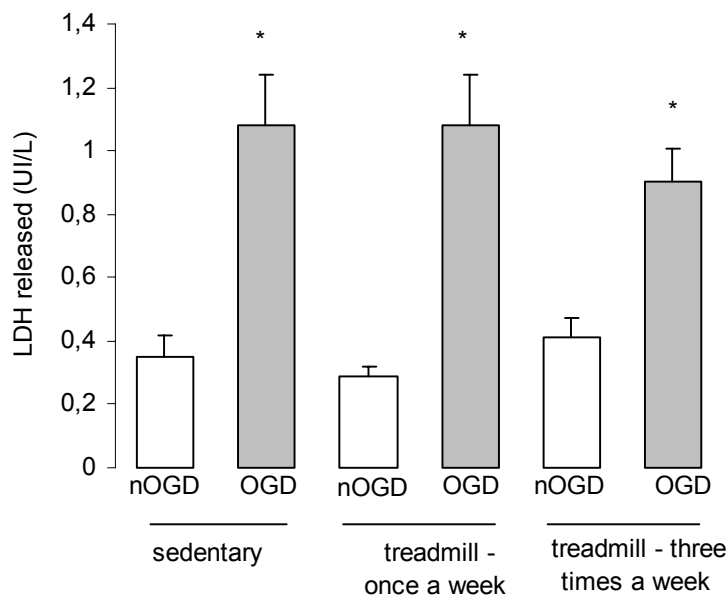
B



#### Figura 4 (referente à dissertação)

Fig. 2. Effect of 20 min treadmill exercise (once and three times a week, 12 weeks, panel A - and twice a day, daily, 21 days– panel B) on cell injury, as assessed by LDH release to the medium, in hippocampal slices from rats exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD) and reoxygenation. Differences between the deprivation condition (OGD) and the control condition (NPOG) (taken as 100%) are on panel C. Columns represent mean  $\pm$  SEM of quadruplicates for six to twelve experiments. \* values significantly different from those of non-OGD groups; # values significantly different from the sedentary, once a week and twice daily groups, as determined by Anova followed by Duncan's test ( $P < 0.05$ ).

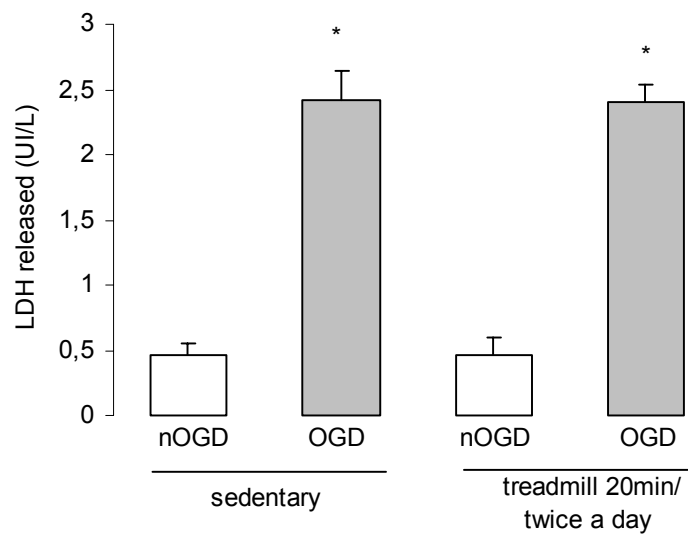
2A





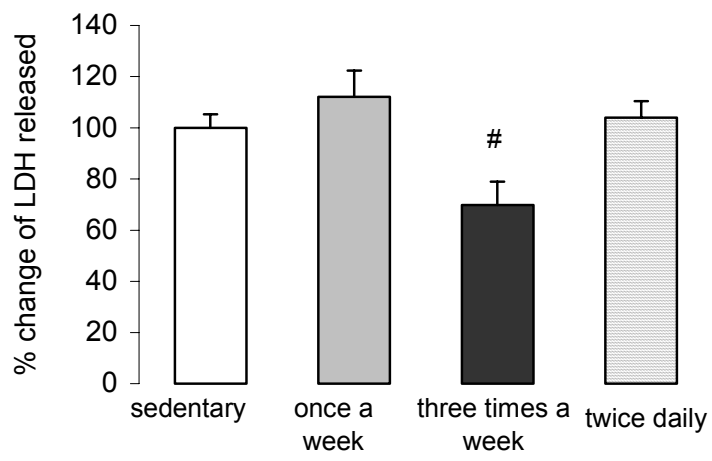
**Figura 5 (referente à dissertação)**

2B (artigo 1)



**Figura 6 (referente à dissertação)**

2C



## **4.2 Artigo 2**

Efeito do exercício físico regular forçado sobre os níveis de BDNF hipocampal em ratos submetidos ao protocolo de treinamento de 20 min diários, durante duas semanas.

OBS: Neste artigo também constam dados que foram realizados através de experimentos da aluna Denise Scopel (referente ao estresse oxidativo), mestre em Neurociências por esta PPG.

**Sumetido ao Neurochemistry International em 15.02.2007**

**Effect of neuroprotective-intensity exercise on oxidative state and BDNF levels in rat hippocampus**

Fernanda Cechetti<sup>1</sup>, Cíntia Fochesatto<sup>2</sup>; Denise Scopel<sup>1</sup>, M.Sc.; Patrícia Nardin<sup>2</sup>, M.Sc.; Carlos A. Gonçalves<sup>2</sup>, PhD; Carlos A. Netto<sup>1,2</sup>, PhD; Ionara R. Siqueira<sup>1,3</sup>, PhD

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas-Neurociências, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, <sup>3</sup>Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Address correspondence to: Ionara Rodrigues Siqueira, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 sala 202, 90050- 170, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3316 3121; E-mail: [ionara@ufrgs.br](mailto:ionara@ufrgs.br)

**Running title:** Effect of moderate exercise on BDNF levels and oxidative status

## **Abstract**

Daily moderate intensity exercise (two-weeks of 20 min/day of treadmill training), which reduces damage in hippocampal slices from rats submitted to ischemia *in vitro*, did not modify any oxidative stress parameters in the hippocampus and the BDNF levels in different brain regions. The aim was to investigate whether the modulation of hippocampal oxidative status and/or brain BDNF content are involved in exercise-induced neuroprotection. The Wistar rats were submitted to daily exercise in the treadmill (20 min/day, two weeks) and were sacrificed approximately 16 hours after the last treadmill running. We have determined several oxidative stress parameters, specifically the free radicals levels, the macromolecules damage, the total reactive antioxidant potential and reactivity levels, which represent the total antioxidant capacity, in hippocampus. In addition, BDNF levels in different cerebral regions of the rat (hippocampus, cortex, striatum, and the cerebellum) were measured by ELISA. The exercise protocol used did not modify any oxidative stress parameters in the hippocampus. Our results suggest that the used exercise protocol did not cause a significant oxidative stress, which would induce an adaptation of the cellular antioxidant system. The treadmill training did not change the BDNF content in brain areas studied, considering the fact of this exercise protocol was neuroprotective, we might speculate that any increase on BDNF levels may not be fundamental to brain cells in the exact moment of ischemic episode.

**Keywords:** moderate exercise; BDNF; oxidative stress; hippocampus, brain,  
treadmill

There are several evidences indicating that physical activity may reduce age-induced cognitive decline and is recommended as a therapeutic strategy to prevent or recover from neurodegenerative disease (Kramer et al., 1999, Mattson, 2000). Although the exact molecular mechanisms by which physical exercise affects brain function are unclear, it has been suggested that it might activate cellular and molecular pathways that contribute to neuroprotection.

Data on exercise effects after cerebral ischemia in humans and in laboratory animals have been contradictory (Salonen et al., 1982; Harmsen et al., 1990; Ellekjaer et al., 1992; Haheim et al., 1993). Experimental models have demonstrated that exercised gerbils submitted to forebrain ischemia demonstrate reduced neuronal damage (Stummer et al., 1994) and the infarct volumes were reduced in exercised rats submitted to focal ischemia (Wang et al., 2001). It is interesting to note that although the forced exercise is more similar to human exercise, most of the studies on exercise employ voluntary exercise as a model (Radák et al., 2006).

Available results obtained by isolated studies suggest that exercise alter brain BDNF levels and oxidative status. It has been described that physical activity induces members of the neurotrophins family, especially brain-derived neurotrophic factor (BDNF), possible modulators of neuronal survival and plasticity (Olliff et al., 1998), maturation and outgrowth in the developing brain and that exert neuroprotective function in mature brain insult (Lee & Paffenberger, 1998).

Exercise induces BDNF mRNA and protein in hippocampus (Neeper et al., 1996; Vaynman et al., 2004).

Another suggested potential mechanism is the modulation of cellular oxidative status. There is a paradox regarding the effects of exercise on oxidative stress, since it can induce free radical formation which may be detrimental for cellular function. It has been suggested that regular exercise causes an adaptation of the cellular antioxidant system, i.e., some works demonstrate a significant increase in antioxidant enzymes activities, which increase resistance against oxidative stress, therefore reducing the cellular oxidative damage (Powers et al., 1994; Leeuwenburgh et al., 1997; Servais et al., 2003). However, the effects of exercise on oxidative damage or antioxidant status of brain are also conflicting, pointing to a rather complex relationship to link physical activity with the brain oxidative status. For example, it has been reported that exercise increases lipid peroxidation in rat brain (Suzuki et al., 1983; Somani, 1994), while, regular exercise attenuates the protein oxidative damage in aged rats (Radák et al., 2001). Interestingly, there is evidence that studies have produced varied outcomes probably because of biases induced by the distinct kinds and intensities of physical activities protocols used (Risedal et al., 1999; Ramsden et al., 2003).

Surprisingly, there are few studies on the effects of exercise on oxidative status in hippocampus, one of the most vulnerable brain regions to oxidative stress (Candelario-Jalil et al., 2001) and/or excitotoxic events like, brain ischemia and to neurodegenerative disorders, as well as is implicated to age-related spatial



learning and memory deficits. It is important to note that literature shows that exercise demonstrates beneficial effects on learning, long-term potentiation, and memory (van Praag et al., 1999; Radák et al., 2001; Ogonovszky et al., 2005).

Recently, we demonstrated that daily moderate intensity exercise (two-weeks of 20 min/day of treadmill training) reduces damage in hippocampal slices from Wistar rats submitted to ischemia *in vitro* (Scopel et al., 2006). It is so reasonable to investigate the possible biochemical mechanisms involved in exercise-induced neuroprotection. Although the BDNF content and oxidative stress have been to participate in the mechanisms of action of exercise, only a few studies have addressed both parameters considering the kind and the intensity of exercise with neuroprotective properties.

The purpose of the present study was to investigate whether the modulation of hippocampal oxidative status and/or brain BDNF content are involved in exercise-induced neuroprotection. In order to expand our previous results, we investigated the neuroprotective effect of moderate exercise on some parameters of cellular oxidative status, namely free radicals content, index of macromolecules damage, and the total antioxidant capacity on rat hippocampus. Additionally, BDNF protein levels in different brain structures (cortex, striatum, hippocampus and the cerebellum) were also investigated. The working hypothesis is that the neuroprotective exercise would improve oxidative status and increase BDNF content in the hippocampus.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats of 2–3 months were maintained under standard conditions (12 h light/12 h dark), with room temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and food (20%, w/w protein commercial chow, Germani, Porto Alegre, RS, Brazil) and water *ad libitum*. All experiments were approved by the Local Animal Care Committee.

### 2.2. Training

Rats were habituated to the treadmill apparatus to minimize novelty stress and randomly assigned to two experimental groups ( $n = 7-8$ ): nonexercised (sedentary) and exercised ( $n = 7-8$ ). The exercise training consisted of running sessions on an adapted motorized rodent treadmill (INSIGHT, São Paulo, Brazil), between 17:00 and 19:00 pm, 5 days/week during two weeks, at 60% of their maximal oxygen uptake (Brooks & White, 1978).

Measurement of oxygen uptake ( $\text{VO}_2$ ) peak was carried out in all animals indirectly before training considering the exhaustion. Each rat ran on the treadmill at a low initial speed followed by increases in speed of 5 m/min every 3 min until the point of exhaustion (i.e., failure of the rats to continue running); the time to fatigue (in min) and workload (in m/min) were taken as indexes of capacity for exercise, that was taken as  $\text{VO}_2$  max.

The intensity of exercise corresponded to 15 to 10 m/ min, equivalent to  $VO_2$  60%. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study. Selected animals that initially refused to run were encouraged by gently tapping their backs. The sedentary (control) groups were transported to the experimental room and handled exactly as the experimental animals were and maintained in the turned off treadmill for 5 min without forcing to run (Scopel et al., 2006).

Rats were sacrificed by decapitation approximately 16 hours after the last treadmill running. The brain regions (hippocampus, frontal cortex, striata and cerebellum) were quickly dissected out and instantaneously placed in liquid nitrogen and stored at  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  until biochemical assays.

### 2.3. Tissue Preparation

On the day of the oxidative stress experiments, hippocampus was homogenized in 10 volumes of ice-cold phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) containing KCl (140 mM) and EDTA (1 mM) in a Teflon-glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at  $960 \times g$  for 10 min to remove nuclei and cell debris; the supernatant, a suspension of mixed and preserved organelles, was used for the assays. The procedures were performed at  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.4. Free radicals levels

To assess the free radicals content we used 2,7- dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe (Lebel et al., 1990). An aliquot of the sample was

incubated with DCFH-DA (100 mM) at 37 °C for 30 min. The reaction was terminated by chilling the reaction mixture in ice. The formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF) was monitored at excitation and emission wavelengths of 488, 525 nm, respectively, using a fluorescence spectrophotometer (Hitachi F-2000). The free radicals content was quantified using a DCF standard curve and results were expressed as pmol of DCF formed/mg protein. All procedures were performed in the dark, and blanks containing DCFH-DA (no homogenate) were processed for measurement of autofluorescence (Driver et al., 2000; Sriram et al., 1997).

#### 2.5. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Lipoperoxidation was evaluated by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) test (Bromont et al., 1989). Aliquots of samples were incubated with 10% trichloroacetic acid (TCA) and 0.67% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was heated (30 min) on a boiling water bath. Afterwards, n-butanol was added and the mixture was centrifuged. The organic phase was collected to measure fluorescence at excitation and emission wavelengths of 515 and 553 nm, respectively. 1,1,3,3-tetramethoxypropane, which is converted to malondialdehyde (MDA), was used as standard.

## 2.6. Oxidation of protein tryptophan residues

Samples were solubilized in sodium dodecyl sulfate (SDS) at a final concentration of 0.1%. The intrinsic tryptophan fluorescence was determined at excitation and emission wavelengths of 280 and 345 nm, respectively, using a fluorescence spectrophotometer Hitachi F-2000 (Gusow et al., 2002).

## 2.7. Oxidation of protein tyrosine residues

Samples were solubilized in SDS at a final concentration of 0.1%. The intrinsic tyrosine fluorescence was determined at excitation and emission wavelengths of 277 and 320 nm, respectively (Bondy, 1996).

## 2.8. Total reactive antioxidant potential (TRAP) assay

TRAP and TAR are based on luminol-enhanced chemiluminescence measurement, induced by an azo initiator (Evelson et al., 2001; Lissi et al., 1992; Lissi et al., 1995). The reaction mixture contained 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP) 10 mM, source of peroxy radicals, and luminol (4 mM) in glycine buffer (0.1 M, pH 8.6). The chemiluminescence (CL) generated was measured in a scintillation counter (Beckman) working in the out of coincidence mode. The addition of Trolox (antioxidant standard, 200 nM) or samples (5.0 ml of sample) decreases CL to basal levels for a period (induction time) proportional to the concentration of antioxidants. The TRAP values were calculated as equivalents of Trolox concentration per mg of protein.

## 2.9. Total Antioxidant Reactivity (TAR) Assay

The reaction mixture contained 2 mM ABAP and 6 mM luminol in glycine buffer. TAR values were determined by assessing the initial decrease of luminescence calculated as the ratio “ $I_0/I$ ”, where “ $I_0$ ” is the CL in the absence of additives, and “ $I$ ” is the CL after addition of the 20 nM Trolox, or the samples. TAR values were expressed as equivalents of Trolox concentration per mg of protein (Lissi et al., 1995).

## 2.10. Analysis of BDNF concentration

BDNF protein was assessed using the E-Max ELISA kit (Promega, USA) according to manufacturer’s recommendations. The brain regions (hippocampus, frontal cortex, striata and cerebellum) were homogenized in lysis buffer (18  $\mu$ l/mg tissue) containing 137 mM NaCl, 20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 1% NP40, 10% glycerol, 1 mM PMSF, leupeptin (1  $\mu$ g/ml), sodium vanadate (0.5 mM), AEBSF (100 mg/ml). Homogenized samples were diluted in two volumes DPBS (Dulbecco’s phosphate buffered saline) buffer (0.2 g KCl, 8.0 g NaCl, 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 654  $\mu$ l 1 M  $\text{MgCl}_2$ , 905  $\mu$ l 1 M  $\text{CaCl}_2$ ) and centrifuged by 3 min at 14000 rpm at 4 °C. Supernatant was collected and diluted 1:2 in block and sample buffer (B&S buffer: supplied with kit). For the ELISA, 96-well flat-bottomed Immulon-2 plates (DYNEX Technologies) were incubated overnight at 4 °C with carbonate-coating buffer containing anti-BDNF monoclonal antibody. Plates were

blocked for 1 h with Block & Sample buffer, followed by incubation with samples in triplicate and BDNF standards in duplicate for 2 h at room temperature with shaking. A standard curve was established using serial dilutions of known amounts of BDNF ranging from 0 to 500 pg/ml, diluted in Block & Sample buffer. Plates were washed 5 X with TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20), followed by incubation with anti-human BDNF polyclonal antibody, five washes with TBST, and 1 h incubation with horseradish peroxidase. Enzyme solution (1:1 TMB and peroxidase substrate) was prepared 1 h in advance and subsequently incubated on the plate for 10 min. After samples turned blue, the reaction was stopped with phosphoric acid and absorbance was read at 450 nm using a plate reader. The *R* value for the standard curve was consistently  $\geq 0.99$ . All sample values were in the linear region of the standard curve.

#### 2.11. Data analysis

Statistical analyses were conducted by two-tailed Student's t-test or two-way ANOVA followed by Tukey's test, when indicated. All data are presented as mean ( $\pm$ S.E.M.).

### 3. Results

Interestingly, the moderate treadmill training during two weeks of 20 min/day that showed to be neuroprotective for *in vitro* ischemia (Scopel et al., 2006) did not modify any oxidative stress parameters in the hippocampus. The exercise did not

modify the content of free radicals in hippocampus, as demonstrated in Figure 1A. The same pattern occurred with the TBARS levels, an index of damage to lipids, since there was no significant difference between exercised and sedentary groups (Fig. 1B). No changes in the amount of tryptophan residues and tyrosine residues, an index of damage in proteins, were observed (Fig. 2). The results of total antioxidant capacity are presented in Figure 3, TAR and TRAP levels were not modified by exercise.

Surprisingly, the exercise did not alter BDNF levels in all studied brain areas (Fig. 4). We observed only a significant difference in the BDNF amount in the hippocampus compared to other studied structures (ANOVA,  $F_{(3,59)}=123.209$ ,  $p<0.001$ ).

#### **4. Discussion**

Epidemiological studies (Lee and Paffenbarger, 1998, Sacco et al., 1998) have shown a neuroprotective effect of moderate physical activity for stroke; these are in agreement with our previous study regarding the moderate-intensity neuroprotective exercise (Scopel et al., 2006). Although the BDNF content and oxidative stress have been suggested to be possible mechanisms of action from exercise, only a few studies have assessed both parameters a protocol of exercise with neuroprotective properties. Our results indicate that the neuroprotective effect of exercise may not be dependent on BDNF expression and oxidative status; therefore, other molecular mechanisms cannot be ruled out.



Surprisingly, no significant changes in the BDNF content were detected in the hippocampus of rats submitted to daily moderate intensity exercise, given that previous studies have demonstrated that physical activity, running and swimming, increases the expression of BDNF in rodent brain (Oliff et al., 1998, Gomez-Pinilla, et al., 2002, Johnson et al., 2003, Neeper et al., 1996, Radák et al., 2006). BDNF protected cultured central neurons against damage (Kokaia et al., 1994, Shimohama et al., 2003), the intracerebroventricular injection of BDNF reduces the hippocampal CA1 damage following transient global ischemia in rats (Beck et al., 1994) and the infarct size after focal cerebral ischemia in rats (Schabitz et al., 1997), as well as it was effective on neonatal hypoxic-ischemic injury model (Almli et al., 2000).

Taken together, the neuroprotective effect of exogenous BDNF administration, and the described influence of BDNF on synaptic plasticity, learning and memory, have prompted the reasoning that the up-regulation of BDNF would be associated to exercise-induced neuroprotective effects (Molteni et al., 2002, Vaynman et al., 2004, Berchtold et al., 2005).

Paradoxically, there is evidence that BDNF may increase neuronal vulnerability to excitotoxicity. Koh and colleagues (1995) demonstrated that treatment with BDNF markedly potentiated the necrotic death induced by exposure to oxygen-glucose deprivation or N-methyl-D-aspartate (NMDA) in murine cortical cell cultures. Accordingly, short-term pre-treatment with BDNF significantly potentiate NMDA-induced neurodegeneration (Prehn, 1996). Then, it has been

considered that neurotrophins can induce neuronal death if introduced at improper levels or times. The molecular mechanisms may be related to effects of BDNF on ions channels, since BDNF can trigger depolarization of neurons by activating the sodium channel (Blum et al., 2002) and can induce calcium release from the endoplasmic reticulum via a pathway activated by a trkB receptor (Rose et al., 2003).

It is important to note that these actions could contribute to pathogenesis of cerebral ischemia/reperfusion, in view of the fact that several molecular injury mechanisms of ischemia are implicated to generalized depolarization and release of glutamate, opening of both voltage-dependent and glutamate-regulated calcium channels, which results in large increase in cytosolic calcium associated with activation of proteases, as calpain, calcineurin, and phospholipases (White et al., 2000). Under these circumstances, neuroprotectors must reduce the excitotoxicity, opposing the excessive release of glutamate and its intracellular effects. Then high levels of BDNF in the the exact moment of ischemic event could exacerbate the neuronal injury produced by excitotoxicity.

However, it is important to note that we did not assess the markers immediately after exercise; the animals were submitted to daily moderate intensity exercise in the treadmill and were sacrificed at least 16 hours after the last treadmill running. Then, we might speculate that any increase on BDNF levels may not be fundamental to brain cells in the exact moment of ischemic episode. In accordance with this idea, BDNF did not alter glutamate-induced decrease of cell

viability in rat cortical cultures, when the incubation was concomitant; however, 24 h pretreatment induced a reduction of neuronal damage (Shimohama et al., 1993). Likewise, the pre-treatment with BDNF reduces the neuronal damage induced by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures, although the post-ischemic treatment was not neuroprotective (Pringle et al., 1996). The post-treatment with BDNF did not protect against behavioral or histological deficits caused experimental traumatic brain injury (Blaha et al., 2000).

It is worth noting that numerous authors reporting the increase of BDNF after exercise do not mention the interval between the end of training and sacrifice of animals.

Nevertheless, our results do not exclude the role of BDNF as a critical component of the molecular mechanisms induced by exercise, since it affects brain plasticity. For example, Ding and colleagues (2006) demonstrated that exercise affects several proteins related to energy metabolism and synaptic plasticity. It is important to cite that exercise upregulates proteins involved in glucose catabolism and ATP synthesis and glutamate turnover (Gomez-Pinilla et al., 2006). Interestingly, BDNF selectively modulate the levels of hippocampal synapse at the presynaptic membrane by increasing of synapsin I and synaptophysin levels (Vaynman et al., 2006).

Other divergent data is that both focal and global cerebral ischemia leads to upregulation of the BDNF gene (Takeda et al., 1993, Kokaia et al., 1995), which

may demonstrate that a later increase on BDNF levels might not affect the molecular mechanisms of ischemia.

Conversely, there are just a few works on the effects of exercise on oxidative status in hippocampus, a vulnerable brain region to excitotoxic events like brain ischemia and to neurodegenerative disorders. The findings about effect of exercise on oxidative stress parameters are conflicting.

The protocol here used did not alter the free radicals content in hippocampus. On the other hand, the level of free radical species in the cerebellum decreased as a result of swimming training during 2 h/day by 6 weeks (Toldy et al., 2005). This divergence may be explained, at least in part, through different brain structure used, as well as by the exercise kind, given that swimming imposes less mechanical stress due to water pressure, recruitment of different muscles and reduced effects of gravity (Flaim et al., 1979).

Our results are in accordance with those obtained with exhaustive exercise in treadmill, showing that it did not modify TBARS levels and antioxidant enzyme activities in the rat hippocampus (Radák et al., 1995, Acikgoz et al., 2006). Moreover, this exercise protocol also did not change levels of DNA damage and protein oxidation in the hippocampus (Radák et al., 1996). Somani et al. (1996) demonstrated that acute exercise in treadmill increases lipid peroxidation in striatum, but not in the cortex, cerebellum, medulla and hypothalamus. Suzuki et al. (1983) reported that voluntary exercise increased the lipid peroxidation in the brain. On the other hand, swimming did not change significantly the oxidative

damage of lipids and DNA, measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and 8-hydroxydeoxyguanosine (Radák et al., 2001, Ogonovszky et al., 2005).

Accordingly, Liu et al. (2000) demonstrated that acute exhaustive exercise does not alter protein and DNA damage in the whole brain. The swimming training attenuated the oxidative damage protein in addition to improve the cognitive functions in young and middle aged rats (Radák et al., 2001).

To our knowledge, this is the first report evaluating exercise effects on hippocampal total antioxidant capacity. Somani et al. (1995) suggest that exercise training in treadmill results in a better redox ratio in cerebral cortex. Our results were contradictory, since exercise did not change any parameter, total antioxidant reactivity and potential indexes in hippocampus. TRAP measurements determine the quantity of antioxidants present in the sample, whereas the TAR assay indicates its reactivity (Lissi et al., 1995; Desmarchelier et al., 1997). TRAP and TAR assays of chemiluminescence production, in reaction of luminol with ABAP-generated peroxy radical, may indicate the ability of a tissue, or a compound, to scavenge peroxy radical,  $O_2^{\cdot-}$  and/or luminol-derived radicals (Lissi et al., 1992). Evelson and colleagues (2001) have evaluated the total amount of antioxidants in rat brain, liver, kidney and heart homogenates and concluded that such procedures seem to evaluate enzymatic and non-enzymatic defenses. TAR may be taken as a useful index of the capacity of a given sample to modulate the damage associated with enhanced production of free radicals (Lissi et al., 1992).

Our results suggest that the exercise protocol used did not cause a significant oxidative stress to alter free radical levels and damage on macromolecules. It has been suggested that exercise, through its continuous free radical generating effect, can induce the oxidative stress and then an adaptation of the cellular antioxidant system, some works demonstrate that a significant increase of the activity of antioxidant enzymes occurs, an adaptation to the exercise-induced oxidative stress (Powers et al., 1994; Leeuwenburgh et al., 1997, Servais et al., 2003). Interestingly, Jolitha and colleagues (2006) showed the combined effects of moderate swimming training and vitamin E supplementation on cellular antioxidant system and oxidative damage of macromolecules, proteins and lipids.

Given the broad physiological meaning of exercise, it is likely that multiple molecular systems can be involved (Poo, 2001). However, our findings suggest that the neuroprotective moderate intensity treadmill exercise does not alter neither oxidative stress markers nor BDNF levels, which might indicates that these biochemical mechanisms are not directly involved on neuroprotective effect.

## **6. ACKNOWLEDGMENTS**

We gratefully acknowledge financial support by PRONEX, FAPERGS, CNPq and PROPESQ-UFRGS.

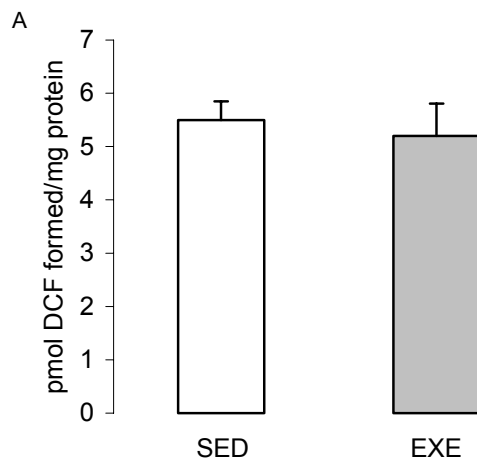
## References

Na sessão **7. Referências Bibliográficas** desta dissertação.

Legends:

Figure 1 (artigo 2). Effects of treadmill daily exercise during 20 min (2 weeks) on free radicals levels (DCF formed, panel A), and lipoperoxidation (TBARS content, panel B) in hippocampus. Results are express as mean  $\pm$  EPM of 6-9 experiments (Student's t test).

1A





1B (artigo 2)

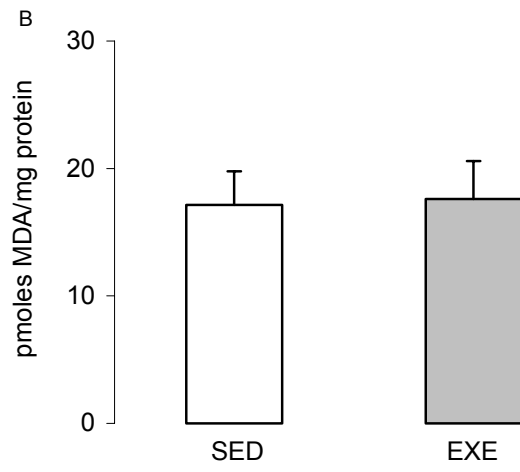


Figure 2 (artigo 2). Effects of treadmill daily exercise during 20 min (2 weeks) on protein damage through tryptophan and tyrosine residues content in hippocampus. Data expressed as percentage of the sedentary control (mean  $\pm$  EPM) of 6-9 experiments (Student's t test).

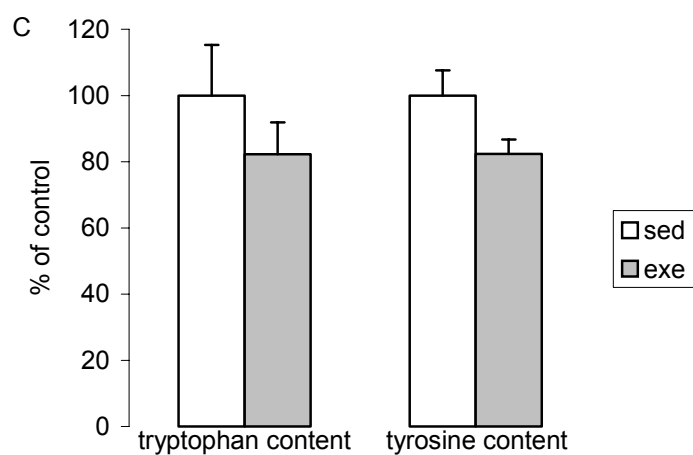
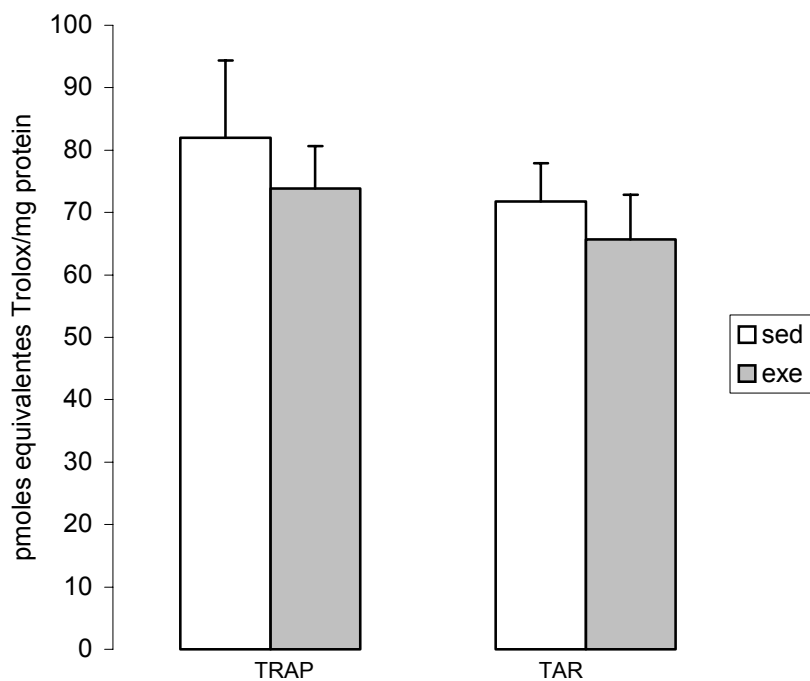
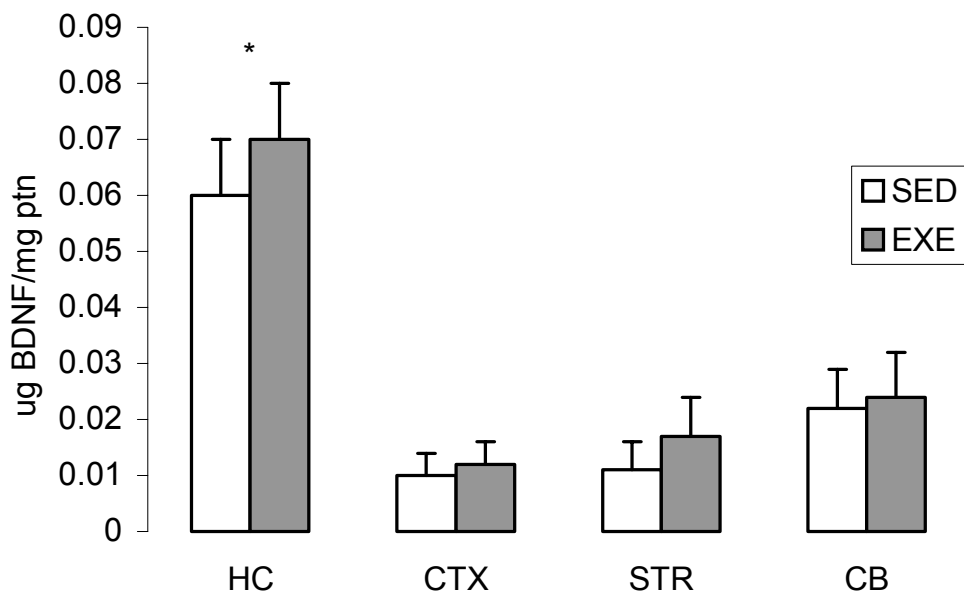


Figure 3 (artigo 2). Total reactive antioxidant potential (TRAP) and Total antioxidant reactivity (TAR) in hippocampus from rats submitted to daily exercise during 20 min (2 weeks). Data are expressed as mean  $\pm$  EPM. N = 6-9 animals/group (Student's t test).



**Figura 7 (referente à dissertação)**

Figure 4 (artigo 2). Quantification of BDNF levels in brain areas from sedentary (SED) and exercised (EXE) rats. HC: hippocampus; CTX: cortex; STR: striatum; CB: cerebellum. The columns represent mean  $\pm$  EPM (Student's t test). Two way ANOVA followed Tukey Test, \* values significantly different from those of CTX, STR and CB.



#### 4.3. Efeito do exercício físico sobre o BDNF (protocolo do 1º trabalho) – Figura não incluída nos artigos.

O exercício físico não causou alteração no conteúdo de BDNF hipocampal nas frequências estudadas  $F_{(2,18)} = 2,243$ ,  $p = 0,135$ .

Figura 8 (referente á dissertação)

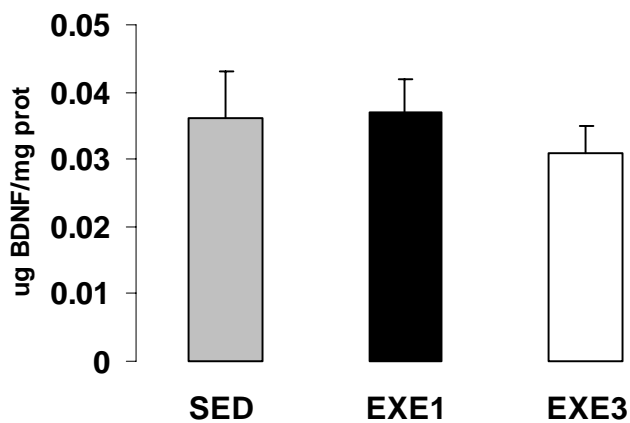


Figura 6 – **Quantificação dos níveis de BDNF hipocampal de ratos sujeitos a 3 meses de treinamento, com frequência de 1 e 3 vezes por semana em esteira motorizada.** As colunas representam média  $\pm$  EPM. Não houve diferença significativa entre os grupos. ANOVA de duas vias seguida de teste de Tukey.

## **5. DISCUSSÃO**

Muitos estudos sugerem que o exercício físico possui a capacidade de produzir efeitos benéficos em certas regiões cerebrais, além de alterações positivas no balanço homeostático, envolvendo alterações hormonais, metabólicas e imunológicas (RADAK *et al.*, 2005). Estudos de mapeamento metabólico sugerem que o hipocampo, o córtex motor e o estriado apresentam alta atividade neuronal durante o exercício, portanto, podem sofrer plasticidade cerebral relacionada à atividade física (VISSING *et al.*, 1996).

Atualmente há pouca informação sobre a intensidade ou a duração em que a essa atividade produziria tais efeitos benéficos. Assim, é importante identificar o nível “ótimo” de exercício capaz de aumentar certas funções fisiológicas, incluindo função cerebral. De outra forma, pouco se sabe sobre os efeitos do treinamento exagerado na função cerebral (RADAK *et al.*, 2005).

Dados recentes de nosso laboratório sobre os efeitos da intensidade da atividade física em fatias hipocampais submetidas a POG, demonstraram que o LDH foi reduzido somente em fatias hipocampais de ratos submetidos à esteira ergométrica durante 20 minutos/dia (moderado) por duas semanas, sugerindo menor morte celular. Paradoxalmente, o exercício com 60 minutos/dia (extenuante) induziu maior dano celular, indicando um efeito aditivo à lise causada pela POG (SCOPEL *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstram que o exercício regular altera a susceptibilidade ao evento isquêmico *in vitro* em fatias hipocampais de animais

exercitados em esteira ergométrica, de forma dependente da frequência desta atividade física (fig. 4). A lise celular foi avaliada pela quantificação da liberação da enzima citosólica LDH no meio de incubação.

A POG aumentou a liberação de LDH nas fatias hipocâmpais, sendo que este aumento foi parcialmente revertido em fatias de animais submetidos ao exercício realizado com frequência de 3 vezes/semana (durante três meses) – fig.4.

É importante notar que a isquemia é a maior causa de incapacidade no Canadá e Estados Unidos, levando a sério comprometimento da qualidade de vida. Portanto, está havendo uma maior ênfase nos métodos de reabilitação intensiva, como o treinamento de corrida com o peso corporal suspenso. Em modelos animais, a corrida apresenta benefícios músculo-esqueléticos e cardiovasculares tanto em cérebros normais como injuriados. Assim, a corrida motorizada tem seu efeito neuroprotetor em vários modelos de injúria isquêmica (PLOUGHMAN *et al.*, 2005).

Nossos resultados suportam achados clínicos (LEE e PAFFENBARGER, 1998) que descrevem a relação entre atividade física e as taxas de incidência de isquemia, onde foi encontrado que diariamente durante 3 semanas, duas vezes ao dia e 1 vez por semana não foi efetivo, três vezes por semana (3 meses) e diariamente por duas semanas de intensidade moderada (SCOPEL *et al.*, 2006) reduz o dano cerebral (fig. 6); e, que a alta intensidade (60 min, diariamente) aumenta a vulnerabilidade celular (Scopel *et al.*, 2006). Estes autores demonstram



que a corrida está associada significativamente com baixo risco, enquanto a alta intensidade está relacionada diretamente com o alto risco (LEE e PAFFENBARGER, 1998).

Outras evidências têm demonstrado que a intensidade moderada regular provoca efeitos favoráveis no encéfalo, incluindo propriedades neuroprotetoras. Por exemplo, o exercício em esteira, por 30 min., 1 vez ao dia, durante 10 dias, aumentou a memória e reduziu a morte celular neuronal induzida pela isquemia no giro denteado de gerbilos (SIM *et al.*, 2005). Em adição, corrida na esteira em baixa intensidade, previne a perda celular neuronal e o dano induzido por agentes citotóxicos (CARRO *et al.*, 2001). Estes resultados também corroboram com a hipótese de que o exercício moderado é neuroprotetor.

Já a atividade mitocondrial (fig.2 e 3), detectada através da redução do MTT, não foi alterada pelo exercício físico regular nas frequências utilizadas (uma e três vezes, durante três meses, 20 minutos e 21 dias, duas vezes ao dia, durante 20 minutos). Contudo, isto não significa que não ocorram disfunções metabólicas; JACKSON e PEREZ-POLO (1996), sugeriram que este ensaio pode não ser apropriado para a detecção de respostas á injúria quando as células apresentam alguma disfunção metabólica, mas permanecem viáveis.

Nossos dados demonstram que células hipocâmpais de ratos exercitados moderadamente apresentam baixa susceptibilidade ao dano de isquemia-reperfusão, suportando a idéia de que a intensidade moderada reduz o dano induzido pela isquemia *in vitro*.

Neste trabalho, demonstramos que diferentes programas de exercício físico regular forçado em esteira ergométrica – diário durante duas semanas ou três vezes/semana durante 3 meses, ambos com duração de 20 minutos – reduziram o dano celular em fatias hipocâmpais de ratos expostas à isquemia *in vitro* (POG). A partir deste efeito neuroprotetor demonstrado, decidimos investigar a participação do BDNF como possível mecanismo de ação.

O BDNF está presente em altas concentrações no hipocampo quando comparados a outras estruturas estudadas, corroborando com as observações de GARZA *et al.* (2004), em que o BDNF é extremamente distribuído em todo Sistema Nervoso Central adulto, mas é no hipocampo que se apresenta em maior concentração (fig.7).

Evidências recentes têm sugerido que comportamentos diários e o estilo de vida, como o exercício físico e o ambiente enriquecido, dois fatores associados também à saúde emocional (ICKES *et al.*, 2000, NEEPER *et al.*, 1996), aumentam os níveis de expressão de BDNF no cérebro (GARZA *et al.*, 2004). A infusão direta de BDNF no mesencéfalo produz um efeito semelhante à administração de antidepressivos em modelos comportamentais, nos paradigmas do desamparo aprendido e da natação forçada (SHIRAYAMA *et al.*, 2002; SIUCIAK *et al.*, 1997). Este efeito pode estar relacionado às ações ansiolíticas e antidepressivas do exercício físico descritas para indivíduos em geral e pacientes com transtornos psiquiátricos (SALMON, 2001).

É interessante reportar que um curto período de treinamento aumenta a expressão de BDNF. RUSSO-NEUSTADT e colaboradores (1999, 2000) demonstraram que dois, sete ou vinte dias de exercício voluntário aumentaram o conteúdo de RNAm de BDNF hipocampal.

Tanto no exercício diário por 2 semanas (fig. 7), quanto nas diferentes freqüências de atividade física crônica (3 meses) (fig. 8), o exercício físico não alterou os níveis de BDNF nas estruturas cerebrais estudadas, podendo estar relacionado ao modelo de exercício (forçado). É importante notar que as sessões de corrida em esteira ergométrica são classificadas como exercício forçado (RADAK *et al.*, 2001; RA *et al.*, 2002), sugerindo que a exposição a este tipo de exercício poderia ser um evento estressante para o animal, ativando as respostas do organismo a estímulos estressantes, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema nervoso simpático. Sabe-se que o nível de BDNF hipocampal pode ser prejudicado em resposta ao estresse (SMITH *et al.*, 1995).

Embora o conteúdo de BDNF tenha sido sugerido como um dos principais mecanismos de ação do exercício físico, poucos estudos têm avaliado o tipo e a intensidade do exercício com suas propriedades neuroprotetoras.

Surpreendentemente, não foram observadas diferenças significativas no conteúdo de BDNF no hipocampo de ratos submetidos ao exercício diário moderado, já que estudos anteriores têm demonstrado que a atividade física, corrida e natação, aumentam a expressão de BDNF em cérebros de roedores (OLIFF *et al.*, 1998, GOMEZ-PINILLA, *et al.*, 2002, JOHNSON *et al.*, 2003,

NEEPER *et al.*, 1996, RADÁK *et al.*, 2006). BDNF protege cultura de neurônios contra danos (KOKAIA *et al.*, 1994, SHIMOHAMA *et al.*, 2003), a injeção intracerebroventricular de BDNF reduz o dano hipocampal na região CA1 seguida de isquemia transitória global em ratos (BECK *et al.*, 1994), reduz o infarto após uma isquemia cerebral focal em ratos (SCHABITZ *et al.*, 1997), e também mostra-se eficiente no modelo de injúria hipóxica/isquêmica em neonatos (ALMLI *et al.*, 2000). Porém, nossos resultados indicam que o efeito neuroprotetor do exercício pode não ser dependente da concentração de BDNF (fig. 7 e 8).

Paradoxalmente, há diversas evidências de que o BDNF pode aumentar a vulnerabilidade neuronal à excitotoxicidade. KOH e CHOI (1987) demonstraram que o tratamento com BDNF potencializou a morte necrótica induzida pela exposição a POG ou NMDA (N-methyl-D-aspartate) em cultura de células corticais de murídeos. De acordo, pré-tratamento a curto prazo com BDNF significativamente potencializou a neurodegeneração induzida pelo NMDA (PREHN, 1996). Então, deve-se considerar que as neurotrofinas podem induzir a morte neuronal se introduzidos em níveis ou tempos inapropriados. O mecanismo molecular pode estar relacionado aos efeitos do BDNF nos canais iônicos, já que ele pode despolarizar os neurônios pela ativação de canais de Na<sup>+</sup> (BLUM *et al.*, 2002) e pode induzir a liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático através da ativação do receptor trkB (ROSE *et al.*, 2003).

É importante notar que essas ações podem contribuir para a patogênese da isquemia/reperfusão cerebral, pelo fato de que injúrias moleculares pelo

mecanismo isquêmico estão implicados na despolarização generalizada e liberação de glutamato, abrindo ambos os canais de cálcio dependentes de voltagem e canais de cálcio regulados por glutamato, que resultam num grande aumento de cálcio citosólico associado com a ativação de proteases, como a calpaina, calcineurina e fosfolipases (WHITE *et al.*, 2000). Dentro destas circunstâncias, neuroprotetores devem reduzir a excitotoxicidade, se opondo a liberação excessiva de glutamato e seus efeitos intracelulares. Então, altos níveis de BDNF no exato momento do evento isquêmico poderia exacerbar a injúria neuronal produzida pela excitotoxicidade.

Entretanto, é importante notar aqui que a determinação deste marcador não foi realizada imediatamente após o exercício; os animais foram submetidos ao exercício regular moderado em esteira e somente foram sacrificados aproximadamente 16 h após a última sessão de treino. Então, nós observamos que o aumento dos níveis de BDNF pode não ser fundamental para as células cerebrais no exato momento do episódio isquêmico. De acordo com esta idéia, o BDNF não alterou a diminuição da viabilidade celular induzida pelo glutamato em culturas corticais de ratos, quando a incubação foi concomitante; entretanto, 24 h de pré-incubação induziu uma redução do dano neuronal (SHIMOHAMA *et al.*, 1993). Do mesmo modo, o pré-tratamento de BDNF reduz o dano neuronal induzido pela POG em cultura hipocampal organotípica, embora, o tratamento pós-isquêmico não seja neuroprotetor (PRINGLE *et al.*, 1996). O pós-tratamento

com BDNF não protegeu contra déficits histológicos e comportamentais causados experimentalmente por uma injúria cerebral traumática (BLAHA *et al.*, 2000).

Nossos resultados não excluem o papel do BDNF como um componente crítico no mecanismo molecular induzido pelo exercício físico; apesar de que ele pode exercer subsequente um efeito neuroprotetor na plasticidade cerebral. Por exemplo, DING e colaboradores (2006) demonstraram que o exercício afeta diversas proteínas relacionadas com o metabolismo energético e plasticidade sináptica. É importante citar que o exercício aumenta a expressão de enzimas envolvidas no catabolismo glicolítico, síntese de ATP e captação de glutamato. (DING *et al.*, 2006). Somado a isso, o BDNF seletivamente modula as sinapses hipocámpais pelo aumento dos níveis de sinapsina e sinaptofisina (VAYNMAN *et al.*, 2006).

Outros dados divergentes estão relacionados à isquemia cerebral focal e global, que levam a uma maior expressão gênica de BDNF (TAKEDA *et al.*, 1993, KOKAIA *et al.*, 1995), mas demonstram que o aumento tardio nos níveis de BDNF não afeta os mecanismos moleculares da isquemia.

Concluindo, nossos resultados sugerem que a neuroproteção causada pelo exercício de intensidade moderada em esteira ergométrica é independente dos níveis de BDNF, demonstrando que esse mecanismo bioquímico não está diretamente envolvido no efeito neuroprotetor deste protocolo.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados do estudo permitem concluir que:

- as células hipocâmpais frente ao exercício moderado apresentam baixa susceptibilidade ao dano isquêmico, de forma dependente da frequência. E que o exercício com intensidade moderada realizado três vezes por semana reduz o dano produzido pela isquemia *in vitro*.

- os níveis de BDNF não sofreram nenhuma alteração significativa como um possível marcador neuroprotetor, demonstrando possivelmente que este mecanismo bioquímico não está diretamente envolvido com o efeito neuroprotetor deste protocolo.



## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Acikgoz, O., Aksu, I., Topcu, A., Kayatekin, B.M., 2006. Acute exhaustive exercise does not alter lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci. Lett.* 406, 148-151.
- Almli, L.M., Hamrick, S.E., Koshy, A.A., Tauber, M.G., Ferriero, D.M., 2001. Multiple pathways of neuroprotection against oxidative stress and excitotoxic injury in immature primary hippocampal neurons. *Dev. Brain Res.* 132, 121– 129.
- Anderson, J.B.; Rapp, N.D.; Baek,H.D.; McCloskey, P.D.; Coburn-Litvak, S.P.; ROBINSON, K.J.,2000. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiology & Behavior.*70, 425-429.
- Arancibia – Tapia. L., Rage, F., Givalois, L., Arancibia, S., 2004. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol.* 25,77-107.
- Barth, A.; Barth, L.; Newell, D.W., 1996. Combination therapy with MK-801 and alpha-phenyltert-butyl-nitron enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp. Neurol.* 141, 330-336.
- Beck, T., Lindholm, D., Castron, E., Wree, A., 1994. Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14, 689-692.
- Berchtold, N.C., Chinn, G., Chou, M., Kesslak, J.P., Cotman, C.W., 2005. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience* 13, 853–61.
- Black, J.E.; Greenough, W.T.; Anderson, B.J.; Isaacs, K.R., 1987. Environment and the aging brain. *Canadian Journal Psychology.* 41, 111-130.

- Blaaha, G.R., Raghupathi, R., Saatman, K.E., McIntosh, T.K., 2000. Brain-derived neurotrophic factor administration after traumatic brain injury in the rat does not protect against behavioral or histological deficits. *Neuroscience* 99, 483-93.
- Blum, R., Kafitz, K.W., Konnerth, A., 2002. Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel Na(V)1.9. *Nature* 419, 687–693.
- Bondy, S.C., 1996. Evaluation of free radical-initiated oxidant events within the nervous system. *Methods Neurosci.* 30, 243– 259.
- Braugher, J.M.; Hall, E.D., 1989. Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 6, 289-30.
- Brooks, G.A., White, T.P., 1978. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise, *J. Appl. Physiol.* 45, 1009-1015.
- Bromont, C., Marie, C., Bralet, J., 1989. Increased lipid peroxidation in vulnerable brain regions after transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* 20, 918–924.
- Bronner, L.L; Kanter, D.S.; Manson, J. E., 1995. Primary prevention of stroke. *New England. J. Med.* 33, 1392-1400.
- Callaghan, D., 2006. The influence of basic conditioning factors on healthy behaviors, self-efficacy, and self-care in adults. *J Holist Nurs.* 24, 178-85.
- Candelario-Jalil, E., Mhadu, N.H., Al-Dalain, S.M., Martinez, G., Leon, O.S., 2001. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci. Res.* 41, 233– 241.

- Cao,W.; Carney J.M.; Duchon, A.; Floyd, R.A., Chevion, M., 1988. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neurosci. Lett.* 88, 233-238.
- Cárdenas, Moro, M.A., Hurtado, O., Leza, J.C., Lorenzo, P., Castrillo, A., Bodelón, O.G., Boscá, O.G., Lizasoain, I., 2000. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices, *J. Neurochem.* 74, 2041-2048.
- Carro, E., Trejo, J.L., Busiguina, S., Torres-Aleman, I., 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy, *J. Neurosci.* 21, 5678–5684.
- Chennaoui, M.; Drogou, C.; Gomez-Merino, D.; Grimaldi, B.; Fillion, G.; Guezenec, C.Y., 2001. Endurance training effects on 5-HT<sub>1B</sub> receptors mRNA expression in cerebellum, striatum, frontal cortex and hippocampus of rats. *Neurosci.* 307, 33-36.
- Cohen, M.M.; Pettegrew, J.W.; Kopp, S.J.; Minschew, N.; Glonek, T., P-31 nuclear magnetic resonance analysis of brain: normoxic and anoxic brain slices. *Neurochem. Res.* V. 9, P. 785-801, 1984.
- Desmarchelier, C., Mongelli, E., Coussio, J., Ciccia, G., 1997. Inhibition of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L). *Miq. Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 85-91.
- Dhooper, A.; Young, C.; Reid, K. H., 1997. Ischemia-induced anxiety following cardiac arrest in the rat. *Behav. Brain Res.* 84, 57-62.

- Ding, Q., Vaynman, S., Souda, P., Whitelegge, J.P., Gomez-Pinilla, F., 2006. Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1265-1276.
- Driver, A.S., Kodavanti, P.R.S., Mundy, W.R., 2000. Age-related increase in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 175–181.
- Dugan, L.; Choi, D., 1999. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. *Basic Neurochemistry: Molec. Cell and Med. Aspects*, 6 edição, Lipincott Williams & Wilkins
- Duman, R.S., 2005. Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. *Neurobiol Aging.* 1, 88-93.
- Ellekjær, E.F., Wyller, T.B., Sverre, J.M., Holmen, J., 1992. Lifestyle factors and risk of cerebral infarction, *Stroke* 23, 829–834.
- Evelson, P., Travacio, M., Repetto, M., Escobar, J., Llesuy, S., Lissi, E.A., 2001. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 261– 266.
- Flaim, S.F., Minter, W.J., Clark, D.P., Zelis, R., 1979. Cardiovascular response to acute aquatic and treadmill exercise in the untrained rat. *J. Appl. Physiol.* 46, 302-308.
- Funahashi, T.; Floyd, R.A.; Carney, J.M., 1994. Age effect on brain pH during ischemia/ reperfusion and pH influence on peroxidation. *Neurobiol. Aging.* 15, 161-167.

- Garza, A.A.; Ha, T.G.; Garcia, C.; Chen, M.J.; Russo-Neustadt, A.A., 2004. Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77, 209-20.
- Gillum, R.F.; Ingram, D.D., 1996. Relation between residence in the southeast region of the United States and stroke incidence. The NHANES I Epidemiologic Followup Study. *Am. J. Epidemiol.* 144, 665-73.
- Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R., Molteni, R., Edgerton, V., 2002. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J. Neurophysiol.* 88, 2187–2195.
- Gusow, K., Szabelski, M., Rzeska, A., Karolczak, J., Sulowska, H., Wiczak, W., 2002. Photophysical properties of tyrosine at low pH range. *Chem. Phys. Lett.* 362, 519–526.
- Håheim, Holme, L.L., Hjermann, I.I., Leren, P., 1993. Risk factors of stroke incidence and mortality: a 12-year follow-up of the Oslo Study, *Stroke.* 24, 1484 –1489.
- Han B.H., D'Costa A., Back S.A., Parsadanian M., Patel S., Shah A.R., Gidday J.M., Srinivasan A., Deshmukh M., Holtzman D.M., 2000. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol. Dis.* 7, 38-53.
- Harmsen, P., Rosengren, A., Tsiropogianni, A., Wilhelmsen, L., 1990. Risk factors for stroke in middle-aged men in Goteborg, Sweden, *Stroke,* 21, 223–229.
- Ickes, B.R.; Pham, T.M.; Sanders, L.A.; Albeck, D.S.; Mohamed, A.H.; Grnholm, A.C., 2000. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophins levels in rat brain. *Exp Neurol.* 164, 45-2.

- Jackson, G.R.; Perez-Polo, J.R., 1996. Paradigms for Study of Neurotrophin Effects in Oxidant Injury, In: Perez - Polo, J.R.; ed. *Methods in Neurosciences*, v.30; San Diego: Academic Press, Inc. p. 1-25.
- Johnson, R.A.; Mitchell, G.S., 2003. Exercise-induced changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: effects of rat strain. *Brain Res.* 983, 108-14.
- Johnson, R., Rhodes, J., Jeffrey, S., Garland Jr., T., Mitchell, G., 2003. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 increases more in mice selected for increased voluntary wheel running. *Neuroscience* 121, 1-7.
- Jolitha, A.B., Subramanyam, M.V., Asha, Devi S., 2006. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Exp. Gerontol.* 41, 753-763.
- Kiprianova I., Sandkuhler J., Schwab S., Hoyer S., Spranger M., 1999. Brain-derived neurotrophic factor improves long-term potentiation and cognitive functions after transient forebrain ischemia in the rat. *Exp Neurol.* 159, 511-9.
- Knüsel, B.; Winskow, J.; Rosenthal, A.; Burton, L.; Seid, D.; Nikolic, K., 1991. Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 961-965.

- Koh J.Y., Choi, D.W., 1987. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay, *J. Neurosc. Methods*, 20, 83-90.
- Kokaia, Z., Metsis, M., Kokaia, M., Bengzon, J., Elmer, E., Smith, M.L., Timmusk, T., Siesjo, B.K., Persson, H., Lindvall, O., 1994. Brain insults in rats induce increased expression of the BDNF gene through differential use of multiple promoters. *Eur. J. Neurosci.* 6, 587-596.
- Kokaia, Z., Zhao, Q., Kokaia, M., Elmer, E., Metsis, M., Smith, M.L., Siesjo, B.K., Lindvall, O., 1995. Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp. Neurol.* 136, 73-88.
- Kramer, A.F., Hahn, S., Cohen N.J., Banich, M.T., McAuley, E., Harrison, C.R., Chason, J., Vakil, E. Bardell, L., Boileau, R.A., Colcombe, A., 1999. Ageing. Fitness and neurocognitive function. *Nature* 400, 418-419.
- Laake, J.H.; Haug, F.M.; Wieloch, T.; Ottersen. O.P., 1999. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Res. Protoc.* 4, 173-184.
- Lebel, C.P., Ali, S.F., McKee, M., Bondy, S.C., 1990. Organometal induced increases in oxygen reactive species: the potential of 20,70-dichloro- fluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 104, 17–24.
- Lee, I.M; Paffenbarger, R.S., 1998. Jr. Physical activity and stroke incidence: the Harvard Alumni Health Study. *Stroke.* 29,2049-54.



- Lee, L.M., Paffenbarger R.S. Jr, 1998. Physical activity and stroke incidence: the Harvard Alumni Health Study, *Stroke* 29, 2049-2054.
- Leeuwenburgh, C., Hollander, J., Leichtweis, S., Griffiths, M., Gore, M., Ji, L.L., 1997. Adaptation of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am. J. Physiol.* 272, 363-369.
- Lissi, E., Pascual, C., del Castillo, M.D., 1992. Luminol luminescence induced by 2,20-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic. Res. Commun.* 17, 299–311.
- Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., del Castillo, M.D., 1995. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 153–158.
- Liu, J., Yeo, H.C., Overvik-Douki, E., Hagen, T., Doniger, S.J., Chyu, D.W., Brooks, G.A., Ames, B.N., 2000. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *J. Appl. Physiol.* 89, 21-28.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Storey, J.M., Storey, K.B., 2001. Influence of exercise on the activity and the distribution between free and bound forms of glycolytic and associated enzymes in tissues of horse mackerel. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 1055-1064.
- Mahabir, S., Leitzmann, M.F., Pietinen, P., Albanes, D., Virtamo, J., Taylor, P.R., 2004. Physical activity and renal cell cancer risk in a cohort of male smokers. *Int J Cancer.* 108,600-5.
- Mattson, MP., 2000. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res.* 886, 47-53.

- Meldrum, B.S., 1990. Pathophysiology of cerebral ischaemia and trauma in relation to possible therapeutic approaches. In: MELDRUM, B.S.; WILLIAMS, M. (Eds) Current and Future Trends in Anticonvulsant, Anxiety and Stroke Therapy. New York: Wiley-Liss. 275-290.
- McCloskey, P.D.; Adamo, S.D.; Anderson, J.B., 2001. Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus Brain Research, 891, 168-175.
- McFarland, D.J.J., 1963. Experimental evidence of the relationship between aging and oxygen want: in search of a theory of aging. Ergonomics. 6, 339-366.
- McIntosh, L.J. Sapolsky, R.M., 1996. Glucocorticoids may enhance oxygen radical-mediated neurotoxicity. Neurotoxicology. 17, 873-882.
- Molteni, I.R., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2002. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. Eur J Neurosci. 16, 1107-1116.
- Mondon, C.E.; Dolkas, C.B.; Sims, C.; Reaven, G.M., 1985. Spontaneous running activity in male rats: effect of age. J. appl. Physiol. 58, 1553-1985.
- Mori, E.; del Zoppo, G.J.; Chambers, J.D.; Copeland, B.R.; Arfors, K.E., 1992. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. Stroke, 23, 712-8.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55-63.

- Neeper, S., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., Cotman, C., 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 726, 49–56.
- Neeper, S.A.; Gomez-Pinilla, F.; Choi, J.; Cotman, C., 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 726, 49-56.
- Netto, C.A.; Hodges, H.; Sinden, J.D.; Lepeillet, E.; Kershaw, T.; Sowinski, P.; Meldrum, B.; Gray, J., 1993a. Effects of foetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water-maze. *Neuroscience*, 54. 69-92.
- Netto, C.A.; Webber, A.; Barlem, A.; Souza, C.; Ruviaro, C.; Zwetsch, G.; Trindade, L.; Arteni, N.; Achierholt, 1995. R. Memory deficits after recovery of transient forebrain ischemia in rats: a preliminary report. *Ciência e Cultura.* 47, 261-265.
- Newell, D.W.; Hsu, S.S.; Papermaster, V.; Malouf, A.T., 1993. Colchicine is selectively neurotoxic to dentate granule cells in organotypic cultures of hippocampus. *Neurotoxicology* . 14, 375-380.
- Nonner, D.; Barrett, E.; Barrett, J., 1996. Neurotrophin effects on survival and expression of cholinergic properties in cultured rat septal neurons under normal and stress conditions. *J. Neurosci.* 6, 6665-75.
- Nunn, J.A.; Lepelleit, E.; Netto, C.A.; Sowinski, P.; Hodges, H.; Gray, J.A.; Meldrum, B., 1991. CA1 cell loss produces deficits in learning and memory in the water maze

- regardless on additional intra- and extra-hippocampal damage, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 11, S338.
- Ogonovszky, H., Berkes, I., Kumagai, S., Kaneko, T., Tahara, S., Goto, S., Radák, Z., 2005. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem. Int.* 46, 635-640.
- Oliff, H.S., Berchtold, N.C., Isackson, P., Cotman, C.W., 1998. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus, *Mol. Brain Res.* 61, 147–153.
- Patel, A.V.; Press, M.F.; Meeske, K.; Calle, E.E.; Bernstein, L., 2003. Lifetime recreational exercise activity and risk of breast carcinoma in situ. *Cancer.* 98, 2161-9.
- Ploughman, M.; Granter-Button, S.; Chernenko, G.; Tucker, B.A.; Mearow, K.M.; Corbett, D., 2005. Endurance Exercise regimens induce differential effects on Brain-derived neurotrophic factor, Synapsin – I and Insulin-like growth factor I after focal ischemia. *Neuroscience.* 136, 991-1001.
- Poo, M.-M. 2001. Neurotrophins as a synaptic modulators. *Nature Rev. Neurosci.* 2, 24-32.
- Powers, S.K., Criswell, D., Lawler, J., Ji, L.L., Martin, D., Herb, R.A., Dudley, G., 1994. Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 266, 376-380.

- Prehn, J.H., 1996. Marked diversity in the action of growth factors on N-methyl-D-aspartate-induced neuronal degeneration. *Eur. J. Pharmacol.* 306, 81-88.
- Pringle, A.K., Sundstrom, L.E., Wilde, G.J., Williams, L.R., Iannotti, F., 1996. Brain-derived neurotrophic factor, but not neurotrophin-3, prevents ischaemia-induced neuronal cell death in organotypic rat hippocampal slice cultures. *Neurosci. Lett.* 211, 203-206.
- Pulsinelli, W.A.; Brierley, J.B., 1979. A new model of bilateral hemisphere ischaemic in the unanesthetised rat. *Stroke.* 10, 267-272.
- Pysh, J.J.; Weiss, G.M., 1979. Exercise during development induces and increases in Purkinje cell dendritic tree size. *Science.* 206, 230-231.
- Ra, S.; Kim, H.; Jang, M.; Shin, M.; Lee, T.; Lim, B.; Kim, E.; Kim, K.; Kim, S., 2002. Treadmill running and swimming increase cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of rats. *Neurosci.* 333, 123-126.
- Rabbo, M.P.S., 2001. Estresse Oxidativo Cardíaco e Hepático em distintas frequências de exercício físico em rato. Porto Alegre. UFRGS. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia, 2001, p. 24-25.
- Radák, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N., Ohno, H., 1995. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol.* 79, 129-35.

- Radák, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucsok, J., Sasvári, M., Nyakas, C., Goto, S., 2001. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int.* 38,17-23.
- Radák, Z.; Goto, S.; Tahara, S.; Kaneko, T.; Kumagai, S.; Berkes, I.; Ogonovszky, H., 2005. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochemistry International.* 46,635-640.
- Radák, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., Jakus, J., Goto, S., 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem. Int.* 49, 387-392.
- Ramsden, M., Berchtold, N.C., Patrick Kesslak, J., Cotman, C.W., Pike, C.J., 2003. Exercise increases the vulnerability of rat hippocampal neurons to kainate lesion, *Brain Res.* 971, 239-244.
- Risedal, A., Zeng, J., Johansson, B.B., 1999. Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 997-1003.
- Rose, C.R., Blum., R., Pichler, B., Lepier, A., Kafitz, K., Konnerth, A., 2003. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin evoked calcium signaling in glial cells. *Nature* 426, 74–78.
- Russel, J.C.; Epling, w.F.; Perce, D.; Amy, R.M.; Boer, D.P., 1987. Induction of voluntary prolonged running by rats. *J. Appl. Physiol.* 63, 2549-2553.

- Russo-Neustadt, A.; Beard, R.C.; Cotman, C.W., 1999. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain-derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology*. 21, 679-682.
- Russo-Neustadt, A.; Beard, R.C.; Cotman, C.W., 2000. Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 101, 305-312.
- Sacco, R.L, Gan, R., Boden-Albala, B., Lin, I.F., Kargman, D.E., Hauser, A., Shea, S., Paik, M.C., 1998. Leisure-time physical activity and ischemic stroke risk: the Northern Manhattan Stroke Study. *Stroke* 29, 380-387.
- Salmon, P., 2001. Effect of physical exercise on anxiety, depression and sensitivity to stress: a unifying theory. *Clinical Psychology Review*. 21, 33-61.
- Salonen, Puska, P., Tuomilehto, J., 1982. Physical activity and risk of myocardial infarction, cerebral stroke and death. *Am. J. Epidemiol.* 115, 526–537.
- Sapolsky R.M., Uno H., Rebert C.S., Finch C.E., 1990. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*. 10, 2897-902.
- Schabitz, W.R., Schwab, S., Spranger, M., Hacke, W., 1997. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 500-506.
- Schimdt – Kastne, R., Freud, T.F., 1991. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience*, 40, 599-636.

- Scopel, D., Fochesatto, C., Cimarosti, H., Rabbo, M., Belló-Klein, A., Salbego, C., Netto, C.A., Siqueira, I.R., 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull.* 71,155-159.
- Servais, S., Couturier, K., Koubi, H., Rouanet, J.L., Desplanches, D., Sornay-Mayet, M.H., Sempore, B., Lavoie, J.M., Favier, R., 2003. Effect of voluntary exercise on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by subsarcolemmal, and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 35, 24-32.
- Shearman, M.S., Hawtin, S.R., Tailor, V.J., 1995. The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by beta-amyloid peptides, *J. Neurochem.*, 65, 218-227.
- Shimohama, S., Tamura, Y., Akaike, A., Tsukahara, T., Ohara, O., Watanabe, S., Kimura, J., 1993. Brain-derived neurotrophic factor pretreatment exerts a partially protective effect against glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Neurosci Lett.* 164, 55-58.
- Shirayama Y., Chen A.C., Nakagawa S., Russell D.S., Duman R.S., 2002. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci.* 22, 3251-61.
- Siesjo, B.K. Agardh C.D., Bengtsson F., 1989. Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 1, 165-211,.
- Siesjo, B.K., 1978. *Brain Energy Metabolism*, John Wiley ed. New York.



- Sim, Y.J., Kim, K., 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, C.J., 2005. Long-term treadmill exercise overcomes ischemia-induced apoptotic neuronal cell death in gerbils, *Physiol. Behav.*, 84, 733-738
- Siuciak, J.A.; Lewis, D.R.; Wiegand, S.J.; Lindsay, R.M., 1997. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacol Biochem Behav.* 56, 131-7.
- Smith, M.L.; Auer, R.N.; Siesjo, B.K., 1984. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2- 10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathologica*, 64, 319-332.
- Smith, M.A.; Makino, S.; Kvetnansky, R.; Post, R.M. 1995. Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann NY Acad Sci.* 771, 234-9.
- Smith, M.A., 1996. Hippocampal vulnerability to stress and aging: possible role of neurotrophic factor. *Behav Brain Res.* 78, 25-36.
- Somani, S.M., Husain, K., Schlorff, E.C., 1994. Response of antioxidant system to physical and chemical stress. In: Baskin S.I., Salem H., editors. *Oxidants, Antioxidants and Radicals*. Washington: Taylor and Francis, pp. 125-143.
- Somani, S.M., Ravi, R., Rybak, L.P., 1995. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50, 635-639.
- Somani, S.M., Husain, K., 1996. Exercise training alters kinetics of antioxidant enzymes in rat tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38, 587-595.

- Sriram, K., Pai, K.S., Boyd, M.R., Ravindranath, V., 1997. Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res.* 749, 44–52.
- Stummer, W., Weber, K., Tranmer, B., Baethmann, A., Kempfski, O., 1994. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia, *Stroke* 25, 1862–1869.
- Suzuki, M., Katamine, S., Tatsumi, S., 1983. Exercise-induced enhancement of lipid peroxid metabolism in tissues and their transference into brain in rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 29, 141-151.
- Tavares, A.; Comarosti, H.; Valentim, L.; Salbego, C., 2001. Profile of phosphoprotein labeling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroreport.* 12, 2705-2709.
- Taylor, C.P.; Burke, S.P.; Webwe, M.L., 1995. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. *J. Neurosci. Methods.* 59, 121-128.
- Ventimiglia, R.; Mathe, R.P.; Jones, B.; Lindsay, R., 1995. The neurotrophins BDNF, NT-3, NT-4/5 promote survival and morphological and biochemical differentiation of striatal neurons in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 7, 213-222.
- Vissing, J.; Anderesen, M.; Diemer, N.H., 1996. Exercise-induced changes in local cerebral glucose utilization in the rat. *J. Cereb.Blood Flow Metab.* 16, 729-736.

- Volpe, B.T.; Pulsinelli, W.A.; Davis, H.P., 1985. Amnesia in human and animals after ischemic cerebral injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 444, 492-492.
- Takeda, A., Onodera, H., Sugimoto, A., Kogure, K., Obinata, M. and Shibahara, S., 1993. Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia, *Neuroscience* 55, 23-31.
- Toldy, A., Stadler, K., Sasvari, M., Jakus, J., Jung, K.J., Chung, H.Y., Berkes, I., Nyakas, C., Radák, Z., 2005. The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 65, 487-493.
- Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2, 266-270.
- Vaynman, S. , Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2004. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2580–2590.
- Vaynman, S. , Ying, Z., Yin, D., Gomez-Pinilla, F., 2006. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res.*1070, 124-130.
- Wang, R.Y., Yang, Y.R., Yu, S.M., 2001. Protective effects of treadmill training on infarction in rats, *Brain Res.* 922, 140–143.

- White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S., 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J. Neurol. Sci.* 179, 1-33.
- Wilmore, J.H.; Costil, D.L., 2001. *Fisiologia do Esporte e do Exercício*. 2º edição, Editora Manole, São Paulo.
- Yang, Y.R.; Wang, R.Y.; Wang, P.S.G., 2003. Early and treadmill training after brain ischemia in rats. *Neuroscience Letters*. 339, 91-94.
- Yuan, J.L.; Yankner, B., 2000. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 407, 802-9.

## **8. ANEXOS**

## **8.1 Anexo A**

### **Carta de submissão do Artigo 1**

## **8.2 Anexo B**

### **Carta de submissão do artigo 2**

