

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

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A MEMÓRIA E SOBRE  
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES NO HIPOCAMPO E NO  
MÚSCULO DE RATOS SENESCENTES**

**CLÁUDIA VANZELLA**

Porto Alegre

2017

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

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A MEMÓRIA E SOBRE  
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES NO HIPOCAMPO E NO  
MÚSCULO DE RATOS SENESCENTES**

**CLÁUDIA VANZELLA**

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

**Co-orientadora: Profa. Dra. Angela Terezinha de Souza Wyse**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –  
Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Doutora em Bioquímica

Porto Alegre

2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Vanzella, Cláudia

Efeitos do exercício físico moderado sobre a memória e sobre parâmetros bioquímicos e moleculares no hipocampo e no músculo de ratos senescentes / Cláudia Vanzella. -- 2017.

118 f.

Orientador: Carlos Alexandre Netto.

Coorientadora: Angela Terezinha de Souza Wyse.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. exercício físico. 2. envelhecimento. 3. estresse oxidativo. 4. fatores neurotróficos. 5. enzimas Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e AChE. I. Netto, Carlos Alexandre, orient. II. de Souza Wyse, Angela Terezinha, coorient. III. Título.

## **Dedicatória**

*Dedico esta Tese àqueles que me deram a vida e não mediram esforços para que eu pudesse realizar este sonho, meus queridos pais Cláudio e Odila!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus que é esta força maior, que me ampara, me dá forças e me ilumina nos momentos mais difíceis.

Ao meu querido orientador Prof. Alex, obrigada por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa. Agradeço pelos inúmeros ensinamentos, pelo exemplo, pelo conhecimento compartilhado e por me fazer entender que tudo tem o seu tempo.

À minha co-orientadora Profa. Angela, pelo exemplo de dedicação e paixão pela bioquímica que levarei sempre comigo. Obrigada pelos “bons fluidos”!

À todos os colegas e amigos do laboratório de Isquemia Cerebral, muito obrigada! Meu agradecimento especial ao Eduardo, pelo auxílio e ensinamentos com o Water maze, pela amizade e paciência. Ao Fabrício (Fafa) e ao Felipe (Fifi), que me estenderam a mão em momentos muito importantes relacionados aos artigos, obrigada, sem vocês tudo teria sido muito mais difícil! A Luz Elena, que se tornou uma grande amiga, por quem tenho muita admiração pela força, determinação e competência, que me ajudou muito também com as estatísticas, obrigada! A Janine, pela amizade e carinho, pelo ombro amigo nos momentos difíceis.

Aos colegas do lab 36! Agradeço Jana, Aline e Tiago pelos experimentos, mas em especial a Jana pela contribuição com ideias, auxílio e discussão dos resultados.

À Adri, pelas colaborações, discussão de resultados e pela amizade! Foi muito bom poder contar contigo.

À família. Aos meus pais, Cláudio e Odila, que jamais mediram esforços para me dar àquilo que jamais alguém poderá me roubar: meus estudos! Ao meu irmão, Arthur, obrigada pelo apoio e carinho sempre! Obrigada por acreditarem em mim e por terem embarcado neste sonho comigo e, acima de tudo, por acreditarem que um dia eu chegaria lá! Amo MUITO vocês!

Ao meu amor, meu companheiro e porto seguro, Ernani! Muito obrigada por me apoiar e estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida! Te amo!

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial a Cléia,  
sempre muito prestativa.

Aos funcionários do biotério por tornarem nossas pesquisas viáveis.

À CAPES pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b>	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xi
<b>RESUMO</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	3
1.1 Envelhecimento	4
1.2 Exercício Físico	10
1.2.1 Exercício Físico e Memória	13
<b>2. OBJETIVOS</b>	21
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
<b>3. CAPÍTULO I</b>	23
<b>Artigo:</b> Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats – submetido ao periódico <i>Behavioural Brain Research</i>	
<b>4. CAPÍTULO II</b>	49
<b>Manuscrito:</b> Forced treadmill exercise prevents spatial memory deficits in aged rats probably through the activation of Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPase in the hippocampus – publicado no periódico <i>Neurochemical Research</i>	
<b>5. CAPÍTULO III</b>	58
Efeito do exercício físico sobre o estado oxidativo celular no músculo esquelético (sóleo) de ratos Wistar machos de 3 e 22 meses de idade.	
<b>6. DISCUSSÃO</b>	79
<b>7. CONCLUSÕES</b>	91
<b>8. PERSPECTIVAS</b>	94
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	96

## APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em tópicos, a saber: **Introdução, Objetivos, Capítulos 1 a 3, Discussão, Conclusões, Perspectivas e Bibliografia.**

A **Introdução** apresenta o embasamento teórico que nos levou a formular a proposta de trabalho. Os **Objetivos** – geral e específicos – estão dispostos no corpo da tese e em maiores detalhes inseridos dentro de cada trabalho. Os **Capítulos** contêm os resultados apresentados na forma de trabalhos publicados em inglês (capítulo 1 - manuscrito submetido, capítulo 2 – artigo publicado), e os resultados referentes ao terceiro objetivo são apresentados em português.

O tópico **Discussão** apresenta uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos. Nas seções **Conclusões e Perspectivas** são apresentadas as conclusões da tese e algumas possibilidades de futuros trabalhos a partir dos resultados obtidos.

A **Bibliografia** contém somente as referências dos trabalhos citados nos tópicos **Introdução, Capítulo 3 e Discussão.**



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Representação esquemática do estresse oxidativo celular 6
- Figura 2.** Desenho esquemático da formação de espécies reativas nas células 7
- Figura 3.** Hormese e exercício 15
- Figura 4.** Efeito do exercício sobre o aprendizado através da cascata de fatores de crescimento 18

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Desenho experimental 39
- Figura 2.** Efeito do envelhecimento e do exercício sobre a latência para encontrar a plataforma durante as cinco sessões de treino na tarefa de memória de referência no Water maze 40
- Figura 3.** Efeito do envelhecimento e do exercício sobre (A) conteúdo de radicais livres, (B) lipoperoxidação e (C) razão SOD/CAT 41
- Figura 4.** Efeito do envelhecimento e do exercício sobre a expressão de (A) BDNF, (B) NT-3, (C) IFG-I e (D) VEGF. 44

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Desenho experimental 52
- Figura 2.** Efeito do envelhecimento e do exercício sobre a latência para encontrar a plataforma durante as cinco sessões de treino na tarefa de memória de referência no Water maze 53
- Figura 3.** Efeito do envelhecimento e do exercício sobre o desempenho da memória de trabalho no Water maze 53
- Figura 4.** Efeito do envelhecimento, do treinamento cognitivo e do exercício combinado com o treinamento cognitivo sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo de ratos 54

**Figura 5.** Correlações encontradas para os ratos envelhecidos: (A) 54  
correlação entre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e a memória de  
referência e (B) correlação entre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e a  
memória de trabalho.

**Figura 6.** Efeito do envelhecimento, do treinamento cognitivo e do 55  
exercício combinado com o treinamento cognitivo sobre a atividade da  
AChE no hipocampo de ratos

### **CAPÍTULO III**

**Figura 1.** Desenho experimental 63

**Figura 2.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de 69  
espécies reativas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

**Figura 3.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a 70  
lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

**Figura 4.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de 70  
sulfidrilas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

**Figura 5.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de 71  
proteínas carboniladas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de  
idade

**Figura 6.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da 72  
SOD no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

**Figura 7.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da 73  
CAT no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

**Figura 8.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da 73  
GPx no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade

### **DISCUSSÃO**

**Figura 5.** Efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre a 87  
memória, parâmetros de estado oxidativo celular, expressão de fatores  
neurotróficos e atividade das enzimas AChE e  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ ATPase no  
hipocampo de ratos de 3 (jovens) e 22 meses (senescentes) de idade  
(LPO; lipoperoxidação)

**Figura 6.** Efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre 89  
parâmetros de estado oxidativo celular no hipocampo e no músculo  
sóleo de ratos de 3 (jovens) e 22 meses (senescentes) de idade (LPO;  
lipoperoxidação)

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Efeito do envelhecimento sobre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 54  
e AChE no hipocampo de ratos naïve

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACh:** acetilcolina

**AChE:** acetilcolinesterase

**AO:** antioxidante

**BHE:** barreira hematoencefálica

**BDNF:** fator neurotrófico derivado do encéfalo

**CAT:** catalase

**DCF:** 2'7'-diclorofluoresceína

**DTNB:** 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico)

**EXE:** exercitado

**GPx:** Glutaciona peroxidase

**GSH:** glutaciona

**GSSH:** glutaciona oxidada

**HCl:** ácido clorídrico

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrogênio

**H<sub>2</sub>DCF:** 2'7'-dicloro-diidro-fluoresceína

**H<sub>2</sub>DCF-DA:** diacetato de 2'7'-dicloro-diidro-fluoresceína

**IGF-1:** fator de crescimento semelhante a insulina-1

**KCl:** cloreto de potássio

**MDA:** malondialdeído

**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

**Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase:** adenosina trifosfatase de sódio e potássio

**Sistema NE:** sistema noradrenérgico

**NMDA:** N-metil D-aspartato

**NT-3:** neurotrofina-3

**NO:** óxido nítrico

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** radical ânion superóxido

**OH:** radical hidroxila

**RL:** radicais livres

**ROS:** espécies reativas de oxigênio

**SED:** sedentário

**SOD:** superóxido dismutase

**TBARS:** substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**VEGF:** fator de crescimento endotelial vascular

**VO<sub>2</sub> máx:** consumo máximo de oxigênio

## RESUMO

O envelhecimento é um processo no qual ocorrem alterações estruturais e funcionais da maioria dos órgãos, que podem levar ao aumento da susceptibilidade a várias doenças associadas à idade. Assim, várias estratégias têm sido investigadas a fim de se reduzir os sintomas relacionados à idade e o exercício físico tem demonstrado efeito neuroprotetor em diferentes modelos experimentais. Nesta tese, investigamos os efeitos do exercício físico moderado sobre a memória e sobre parâmetros bioquímicos no hipocampo e no músculo sóleo de ratos Wistar de 3, 6 e 22 meses de idade. Para isso, foram realizados três experimentos distintos que deram origem aos três capítulos apresentados na tese. No primeiro experimento, estudamos o efeito do exercício físico em ratos de 3 e 22 meses de idade. Neste experimento, o exercício preveniu o déficit de aquisição da memória de referência relacionado à idade. Além disso, preveniu o aumento do estresse oxidativo no hipocampo de ratos envelhecidos e também promoveu o aumento da expressão dos fatores neurotróficos BDNF, NT-3 e IGF-1 no hipocampo destes animais. É importante ressaltar que houve uma correlação positiva entre a redução do estresse oxidativo e a latência para encontrar a plataforma no 5º dia de treino na tarefa de memória de referência, ou seja, a redução do conteúdo de espécies reativas e da lipoperoxidação pelo exercício está correlacionada com a melhora do desempenho de memória dos ratos envelhecidos. No segundo experimento, avaliamos o efeito do exercício físico em ratos de 3, 6 e 22 meses de idade. Corroborando com os resultados apresentados no experimento anterior, foi demonstrado que o exercício físico moderado preveniu os déficits de memória espacial de referência e de trabalho relacionados à idade. O treinamento cognitivo no Water maze aumentou a atividade das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e AChE no hipocampo de ratos adultos e envelhecidos. O aumento na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi ainda maior nos ratos envelhecidos submetidos ao exercício físico combinado com o treinamento cognitivo. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo dos ratos envelhecidos exercitados e a latência para encontrar a plataforma no 5º dia de treino na tarefa de memória de referência, ou seja, o aumento da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase está associado com a melhora do desempenho de memória relacionado ao exercício físico. De acordo com esses dados, também foi observada uma correlação negativa entre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e a diferença ( $\Delta$ ) entre a média das latências entre os trials 1 e 4 na tarefa de memória de trabalho, o que demonstra que os ratos envelhecidos exercitados apresentaram um melhor desempenho na tarefa de memória de trabalho associado com o aumento na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase. No terceiro experimento, investigamos o efeito do exercício físico em ratos de 3 e 22 meses de idade. O exercício aumentou o conteúdo de espécies reativas e a lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos jovens. Ratos envelhecidos apresentaram um aumento da lipoperoxidação e uma redução na atividade da enzima catalase. O exercício induziu um aumento dos níveis de espécies reativas, uma redução no conteúdo de sulfidrilas e o aumento de proteínas carboniladas; contudo, promoveu o aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no sóleo dos ratos envelhecidos. Assim, os resultados do primeiro e do segundo experimento demonstram que o exercício físico preveniu o declínio da memória espacial relacionado à idade e que esse efeito pode ser mediado por fatores que incluem a redução do estresse oxidativo, o aumento da expressão de fatores neurotróficos e o aumento da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo de ratos envelhecidos. Os resultados do músculo demonstram que o sóleo dos ratos jovens, embora susceptível ao aumento das espécies reativas e lipoperoxidação, não apresentou dano às proteínas, sugerindo que outros mecanismos, como o sistema de defesa antioxidante não enzimático, possam estar atuando para compensar os efeitos do exercício. Além disso, o músculo dos ratos envelhecidos parece ser mais sensível que o dos ratos jovens às alterações do estado oxidativo celular induzidas pelo exercício físico, porque apesar dos animais envelhecidos exercitados apresentarem um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, não houve uma redução do dano oxidativo.

**Palavras-Chave:** exercício físico, envelhecimento, ratos, estresse oxidativo, fatores neurotróficos, enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e AChE.

## ABSTRACT

Aging is a process in which structural and functional changes occur in most organs and may lead to increased susceptibility to various age-related diseases. Several approaches have been investigated with the aim of reducing age-related symptoms and physical exercise is a therapeutic strategy that has presented neuroprotective action in different experimental models. In this context, some studies show that regular physical exercise is related to the improvement of quality of life and to the prevention of age-related cognitive decline. In the present thesis, we investigated the effect of moderate physical exercise on memory and on biochemical parameters in the hippocampus and soleus muscle in 3, 6 and 22 months-old rats. For that, three different experiments were carried out, which gave rise to the three chapters presented in this thesis. In the first experiment, we studied the effect of physical exercise in 3 and 22 months-old rats. In this experiment, the exercise prevented the age-related acquisition deficit of reference memory. In addition, exercise prevented the increased in oxidative stress and also was able to increase the expression of neurotrophic factors BDNF, NT-3 and IGF-1 in the hippocampus of aged rats. It is important to note that there was a positive correlation between the reduction of oxidative stress and latency to find the platform on the 5<sup>th</sup> day of training in the reference memory task, i.e., reduction of reactive species levels and lipid peroxidation, might be associated with the exercise-related memory improvement. In the second experiment, we evaluated the effect of physical exercise in 3, 6 and 22 months-old rats. Corroborating with the results presented in the previous experiment, it was demonstrated that moderate physical exercise prevented age-related spatial reference and working memory deficits. It has also been shown that the cognitive training in Water maze increased the activity of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and AChE enzymes in the hippocampus of adult and aged rats. The increase in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity was even further increased in aged rats that were submitted to physical exercise combined with cognitive training. In addition, a positive correlation was observed between the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus of aged exercised rats and the latency to find the platform on the 5<sup>th</sup> day of training in the reference memory task, i.e., the increase in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity is associated with the exercise-related memory improvement in aged rats. Consistently, a negative correlation between the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and the difference ( $\Delta$ ) between the mean latencies of trials 1 and 4 in the working memory task was also found, i.e., the exercised aged rats showed better performance in the working memory task associated with the increase in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity. In the third experiment, we investigated the effect of physical exercise in 3 and 22 months-old rats. Exercise increased the reactive species content and lipid peroxidation in soleus muscle of young rats. Aged rats showed an increase in lipid peroxidation and a reduction in the catalase activity. Exercise induced an increase in reactive species levels, a reduction in sulfhydryl content and an increase in carbonyl proteins; however, the exercise was able to increase the superoxide dismutase and catalase activities in the soleus of aged rats. Thus, the results of first and second experiments demonstrate that physical exercise prevents the age-related decline of spatial memory and this effect might be related to the reduction of oxidative stress, increased expression of neurotrophic factors and the increase in the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus of aged rats. The muscle results demonstrate that soleus of young rats, although susceptible to the increased in reactive species and lipid peroxidation, showed no damage to proteins, suggesting that other mechanisms, such as the non-enzymatic antioxidant defense system, may be acting to compensate the effects of exercise. In addition, the muscle of the aged rats seems to be more sensitive than the young rats to changes in the cellular oxidative state induced by exercise, since aged exercised animals showed an increase in the activity of antioxidant enzymes, but there was no reduction of oxidative damage. **Key-words:** physical exercise, aging, rats, oxidative stress, neurotrophic factors, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and AChE enzymes.



## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. Envelhecimento

O envelhecimento é um processo biológico complexo caracterizado pelo declínio gradual e progressivo das funções fisiológicas e bioquímicas da maioria dos órgãos, podendo levar ao aumento da susceptibilidade a várias doenças associadas à idade (Paradies *et al.*, 2011; Bo *et al.*, 2013). No Brasil, estima-se que em 50 anos aproximadamente 30% da população estará na faixa etária acima dos 65 anos (IBGE, 2008). Estes dados são relevantes, uma vez que demonstram a importância da pesquisa sobre o envelhecimento, com vistas a contribuir para uma melhor qualidade de vida na terceira idade.

Embora o envelhecimento seja frequentemente acompanhado de condições fisiopatológicas, muitos indivíduos envelhecem sem desenvolver qualquer patologia significativa (Depp e Jeste, 2006). Contudo, mesmo nesses casos há um declínio relativo de várias funções psicofisiológicas, que incluem os processos cognitivos como aprendizado e memória (Aine *et al.*, 2010).

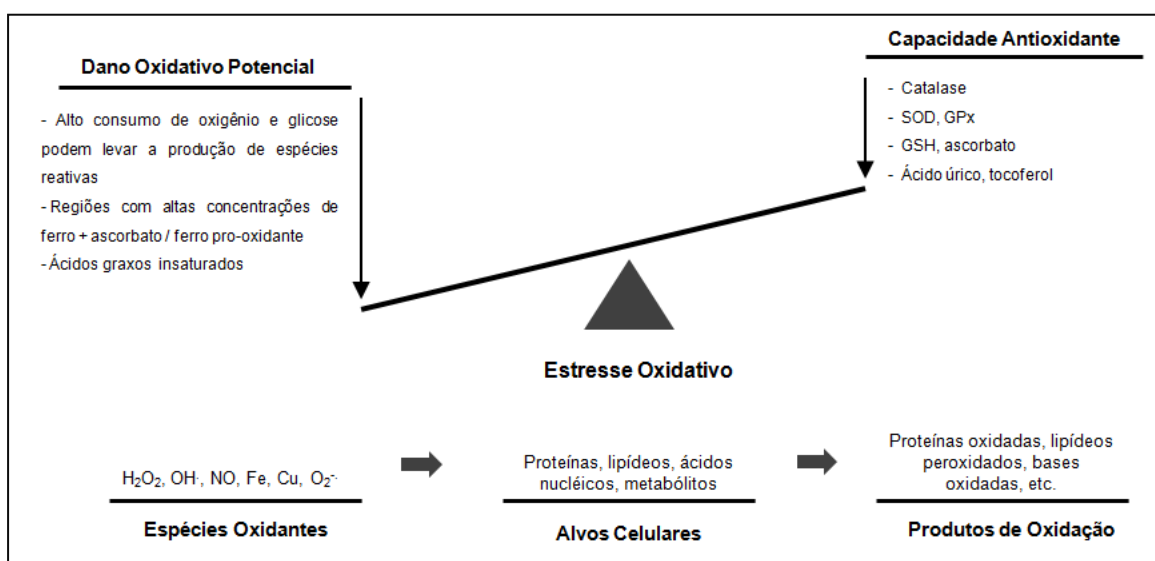
As alterações fisiológicas e estruturais que ocorrem no cérebro durante o envelhecimento podem levar a diferentes graus de declínio cognitivo (Migliore e Coppèdè, 2009). Estudos em seres humanos demonstraram que a memória espacial é uma das principais habilidades cognitivas afetada durante o envelhecimento (Hölscher, 2003). A memória espacial é importante para situar o indivíduo em relação ao seu ambiente por meio da formação de uma representação cognitiva imediata do espaço. Este mapa cognitivo é construído pelo hipocampo, que incorpora os detalhes relativos à velocidade e direção do movimento, assim como a informação relacionada ao espaço e aos objetos (O'Keefe e Nadel, 1979; Hölscher, 2003). Enquanto os indivíduos envelhecidos podem lembrar-se da quantidade de itens em uma tarefa de memória espacial, eles apresentam déficits na contextualização espacial destes itens, o que

demonstra que a ativação do hipocampo e das estruturas cerebrais relacionadas durante esta tarefa de navegação espacial está atenuada em indivíduos envelhecidos (Moffat *et al.*, 2006; Kukulja *et al.*, 2009).

Estudos em roedores também demonstram que o envelhecimento está relacionado com um pior desempenho em tarefas de memória, tanto em tarefas espaciais, como o labirinto aquático de Morris (Zhang *et al.*, 2012; Haider *et al.*, 2014; Taridi *et al.*, 2014) quanto em tarefas aversivas, como a esQUIVA inibitória (Lovatel *et al.*, 2013; Bertoldi *et al.*, 2017).

A hipótese dos radicais livres e do estresse oxidativo tem sido muito estudada nos últimos anos entre as possibilidades para explicar o processo de envelhecimento (Harman, 1956; Tiana *et al.*, 1998; Liochev, 2013) (Figura 1) e vários estudos em animais experimentais demonstram que o aumento da idade é acompanhado pelo desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e as defesas antioxidantes teciduais (Sanz *et al.*, 1997; Floyd e Hensley, 2002; Savitha *et al.*, 2005). Conceitualmente, **radicais livres** são moléculas que apresentam um elétron desemparelhado no seu orbital mais externo, o que faz com que sejam substâncias altamente instáveis e reativas (Halliwell, 1991, 2012). Muitas espécies reativas são centradas no oxigênio e por isso denominadas de **espécies reativas de oxigênio (EROS)**, que podem ser um radical livre, como o radical hidroxila (OH), ou podem ser outras substâncias reativas que não são radicais livres, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Gomes *et al.*, 2012). Por outro lado, um **antioxidante** é definido como uma molécula responsável por neutralizar os efeitos de um radical livre ou de uma espécie reativa, doando um elétron para esta molécula e estabilizando-a, sem tornar-se um radical livre (Vannucchi *et al.*, 1998). O organismo dos mamíferos possui antioxidantes não-enzimáticos, como as vitaminas C e E, por

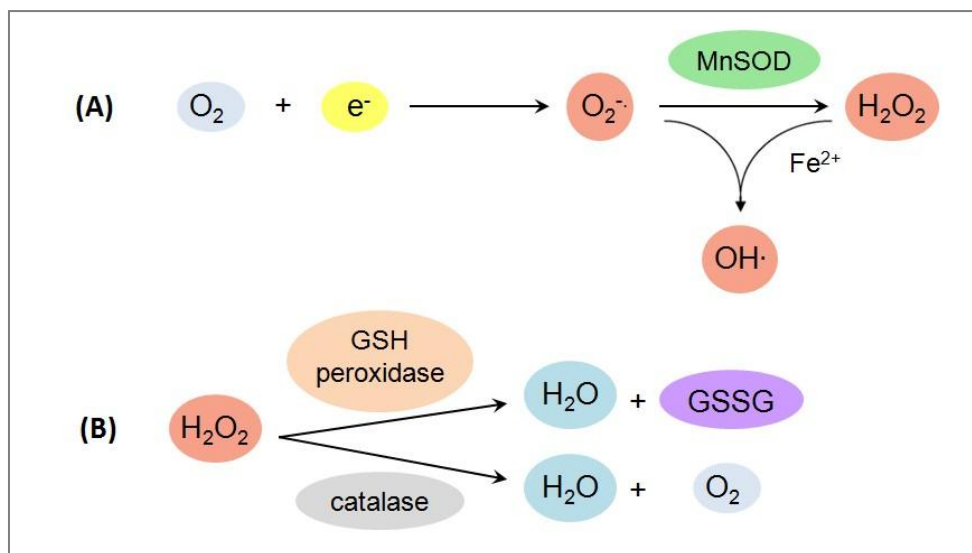
exemplo, e antioxidantes enzimáticos, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Quando há um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a atividade do sistema de defesa antioxidante, ocorre o estresse oxidativo, fenômeno envolvido em muitos processos patológicos (Betteridge, 2000; Evans *et al.*, 2000; Halliwell, 2012).



**Figura 1.** Representação esquemática do estresse oxidativo celular. As espécies oxidantes são produzidas e interagem com os alvos celulares gerando produtos de oxidação única e estes, em alguns casos, causam estresse oxidativo nos tecidos.  $H_2O_2$ , peróxido de hidrogênio; OH, radical hidroxila; NO, óxido nítrico, Fe, ferro; Cu, cobre;  $O_2^-$ , radical ânion superóxido; SOD, superóxido dismutase, GPx, glutathiona peroxidase; GSH, glutathiona (**Adaptado de** Floyd e Hensley, 2002).

O **estresse oxidativo** também está relacionado com declínio de memória associado à idade (Pietá Dias *et al.*, 2007). O cérebro é particularmente susceptível aos efeitos das espécies reativas (Figura 2), devido à sua alta taxa metabólica e sua capacidade de regeneração celular diminuída em relação aos outros órgãos. Isto, somado com a redução das defesas antioxidantes e dos mecanismos de reparo durante o envelhecimento, resulta no acúmulo de dano oxidativo, o que pode levar ao aparecimento de doenças

neurodegenerativas. Além disso, existem interações entre o estresse oxidativo e outros mecanismos moleculares que podem causar neurodegeneração, como a ativação de células gliais, disfunção mitocondrial e morte celular programada (Andersen, 2004; Martin e Grotewiel, 2006; Jurgens e Johnson, 2012).



**Figura 2.** Desenho esquemático da formação de espécies reativas nas células. (A) Formação do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a partir de oxigênio ( $O_2$ ) e elétrons de alta energia. O  $O_2^{\cdot-}$  pode ser convertido pela superóxido dismutase (MnSOD) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ou pela reação de Fenton, na presença de ferro ( $Fe^{2+}$ ), em radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). (B) Decomposição do  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e  $O_2^{\cdot-}$  pela enzima catalase e em  $H_2O$  e glutatona oxidada (GSSG) pela enzima glutatona peroxidase (GSH peroxidase). (Adaptado de Migliore e Coppedè, 2009).

O **hipocampo** é uma estrutura fundamental para funções cognitivas como aprendizado e memória, e parece ser particularmente vulnerável ao envelhecimento (Serrano e Klann, 2004; Bartsch e Wulff, 2015). Assim, o seu funcionamento adequado depende da atividade de enzimas de membrana que também demonstram ter função importante para a cognição. A  **$Na^+,K^+$ -ATPase** é uma enzima transmembrana essencial, responsável pela manutenção do gradiente eletroquímico através da membrana celular. Além desta função,

alguns estudos têm demonstrado que essa enzima exerce influência sobre o processamento de memória (Wyse *et al.*, 2004; dos Reis-Lunardelli *et al.*, 2007; Morth *et al.*, 2011). Por exemplo, foi relatado que ratos submetidos a um modelo experimental de hiperargininemia, um erro inato do metabolismo do ciclo da uréia, apresentaram uma redução na atividade hipocampal da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e também um declínio significativo na tarefa de memória aversiva, sugerindo um possível envolvimento desta enzima com o processo de aprendizado e memória (Dos Reis *et al.*, 2002). Apesar destas evidências, poucos estudos investigaram a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no cérebro durante o envelhecimento e ainda, quando investigaram, avaliaram a atividade da enzima no cérebro total e não em uma estrutura cerebral específica (Fraser *et al.*, 2001; Carageorgiou *et al.*, 2008).

O **sistema colinérgico** é o principal sistema neurotransmissor envolvido nos sintomas cognitivos da demência e possivelmente do envelhecimento (Bartus *et al.*, 1982; Schliebs e Arendt, 2011); as evidências indicam haver uma depleção múltipla e difusa de vários marcadores bioquímicos em neurônios colinérgicos (Meneses, 1999; Peters, 2006; Lee *et al.*, 2010). Além disso, tem sido demonstrado que o declínio da função colinérgica relacionado à idade pode ser parcialmente responsável pelos déficits de memória de curto (Haider *et al.*, 2014) e de longo prazo (Papandreou *et al.*, 2011) em roedores. Assim, alguns trabalhos demonstraram que há uma redução na atividade da enzima **acetilcolinesterase (AChE)** relacionada com a idade em estruturas cerebrais de roedores (Carageorgiou *et al.*, 2008; Jolitha *et al.*, 2009; Haider *et al.*, 2014). Neste contexto, também foi relatado que a síntese e liberação de acetilcolina, a captação de colina e a densidade dos receptores colinérgicos diminuem com o

envelhecimento, o que pode explicar pelo menos em parte a redução na atividade da AChE (Gibson e Peterson, 1981; Araujo *et al.*, 1990).

As alterações induzidas pelo envelhecimento ocorrem em diversos sistemas fisiológicos. Desta forma, alguns estudos demonstram que o **tecido muscular** também é alvo destas alterações, sendo a principal delas conhecida como sarcopenia do envelhecimento, uma condição associada com declínio progressivo da massa, da força e da função do músculo esquelético em seres humanos (Mitchell *et al.*, 2012). A sarcopenia pode privar o indivíduo de sua independência, afetando sua a qualidade de vida e causando dificuldades para realização das tarefas diárias, além de aumentar o risco de quedas bruscas e fraturas (Szulc *et al.*, 2005).

Estudos em seres em humanos demonstraram que a redução da massa muscular durante o envelhecimento parece ser decorrente de vários fatores, incluindo atrofia de fibras do tipo II (Hunter *et al.*, 2004), inatividade física (Doherty, 2003; Macaluso e De Vito, 2004) alterações do estado hormonal, diminuição da ingestão calórica e proteica, aumento de mediadores inflamatórios e alteração da síntese de várias proteínas (Doherty, 2003).

Apesar da perda da função do músculo esquelético não ser totalmente compreendida, estudos em roedores sugerem o forte envolvimento do aumento do estresse oxidativo (Szczesny *et al.*, 2010). Neste sentido, foi relatado que durante o envelhecimento há um aumento de espécies reativas no músculo esquelético (Jackson, 2011), o que pode estar associado com a redução da captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (Capel *et al.*, 2005); assim o aumento do cálcio intracelular leva não apenas ao aumento de espécies reativas, mas também a oxidação de proteínas musculares e a liberação de fatores apoptóticos (Orrenius *et al.*, 2003).

No que se refere a idade equivalente entre seres humanos e roedores, mais especificamente a espécie *Rattus norvegicus*, de acordo com Sengupta (2013), 1 ano de idade para seres humanos é equivalente a 13,8 dias para ratos. No entanto, este cálculo pode ser usado apenas em certas fases da vida do rato, pois eles têm uma infância breve e acelerada em relação aos seres humanos, tornando-se sexualmente maduros às 6 semanas de idade, o que difere dos humanos, que desenvolvem-se lentamente e não atingem a puberdade até 11-12 anos de idade. Os ratos atingem sua idade adulta aos 6 meses e podem ser considerados envelhecidos com 24 meses, o equivalente a 60 anos para humanos. Nesta tese, utilizamos ratos de 22 meses de idade como grupo senescente; contudo, considerando o tempo de duração dos experimentos até a eutanásia, os mesmos chegaram próximos aos 24 meses de idade.

## **2. Exercício Físico**

O **exercício físico** é uma abordagem não farmacológica que favorece a saúde e o bem-estar e traz benefícios psicológicos, proporciona integração social, melhora a autoestima (Duman, 2005; Reid *et al.*, 2010), bem como promove a redução do risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas associadas à idade em seres humanos (Scarmeas *et al.*, 2009). Além disso, outro ponto que merece destaque é o fato de que a atividade física tem sido considerada uma das estratégias mais acessíveis e importantes para proteger a função cerebral da população em geral (Weuve *et al.*, 2004; Kramer e Erickson, 2007).

Em modelos experimentais foi demonstrado que a atividade física melhora a capacidade cognitiva em ratos envelhecidos (Sampedro-Piquero *et*



*all.*, 2013), atenua os déficits motores, melhora as disfunções neurológicas em diferentes processos neurodegenerativos e atenua a perda neuronal associada à idade (Larsen *et al.*, 2000). Outros estudos também demonstraram que o exercício físico apresenta efeitos benéficos como a melhora da função cerebrovascular, além de promover o aumento da neurogênese, da plasticidade e da secreção de fatores de crescimento (Cotman e Engesser- Cersar, 2002; Zhang *et al.*, 2012).

O exercício físico também promove benefícios metabólicos e adaptações funcionais no **músculo esquelético** durante o envelhecimento em roedores (Tromm *et al.*, 2016). O **sóleo**, um músculo que apresenta uma grande proporção de fibras do tipo I, é um dos músculos mais utilizados durante o exercício de corrida em esteira e apresenta alta atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Powers *et al.*, 1994), sendo um bom modelo para o estudo das alterações fisiológicas induzidas pelo treinamento físico em ratos jovens e envelhecidos (Lambertucci *et al.*, 2007).

Foi demonstrado que em seres humanos o treinamento físico melhora a capacidade física contrátil, a síntese de proteínas (Balagopal *et al.*, 2001) e a função mitocondrial (Menshikova *et al.*, 2007). O exercício de resistência é recomendado para o tratamento e prevenção da sarcopenia, proporcionando uma melhora significativa na função do músculo esquelético em pacientes idosos, tais como a velocidade de marcha e a capacidade de executar tarefas diárias (Frontera *et al.*, 2000; Braith *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que as respostas fisiológicas associadas ao exercício físico dependem do protocolo de treinamento utilizado, que pode variar de acordo com o tipo de motivação (forçado ou voluntário), com a

intensidade do esforço (leve, moderado ou intenso), com a duração (tempo por sessão) e com a frequência com que é realizado (por exemplo, diário, três vezes por semana, etc) (Narath *et al.*, 2001).

No ambiente experimental, o protocolo de treinamento forçado consiste em sessões de corrida em esteira ergométrica ou de nado forçado (Radák *et al.*, 2001), enquanto o livre acesso a uma roda de corrida é considerado um exercício físico voluntário (Russell *et al.*, 1987). Vários trabalhos têm demonstrado diferentes respostas, dependendo do protocolo de treinamento utilizado (Narath *et al.*, 2001; Ang e Gomez-Pinilla, 2007). Tanto o exercício voluntário quanto o forçado têm sido utilizados para investigar os efeitos da atividade física sobre a função cerebral e sobre o músculo esquelético; no entanto, tem-se argumentado que o exercício forçado é mais consistente, uma vez que todos os animais são submetidos às mesmas condições experimentais (Moraska *et al.*, 2000).

Quanto a intensidade do esforço, o exercício físico pode ser classificado como leve, moderado ou intenso, de acordo com o consumo máximo de oxigênio ( $VO_2$  máx), que representa a capacidade máxima que o organismo de um indivíduo tem para captar e utilizar o oxigênio do ar que está inspirando para gerar trabalho. Assim, o teste do  $VO_2$  máx é um instrumento bastante utilizado para a prescrição e orientação de programas de exercício físico. Um exercício leve corresponde entre 30 a 49% do  $VO_2$  máx, um exercício moderado entre 50 a 74%, enquanto que um exercício é considerado intenso acima de 75% do  $VO_2$  máx (American College of Sports Medicine, 1998). Embora a intensidade do esforço seja determinada de acordo com o objetivo de cada estudo, cabe destacar que o exercício moderado tem demonstrado uma melhor ação neuroprotetora quando comparado àqueles de maior intensidade (Scopel *et al.*,

2006).

Nesta tese, utilizamos o protocolo de **exercício forçado** em esteira ergométrica adaptada para ratos e de **intensidade moderada** (60% do VO<sub>2</sub> máx), com duração de 20 minutos por dia e frequência de 3 vezes por semana durante um período total de 4 semanas. Esse protocolo de exercício foi selecionado em função dos resultados obtidos em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa (Ben *et al.*, 2009; Cechetti *et al.*, 2012).

### **1.2.1 Exercício físico e memória**

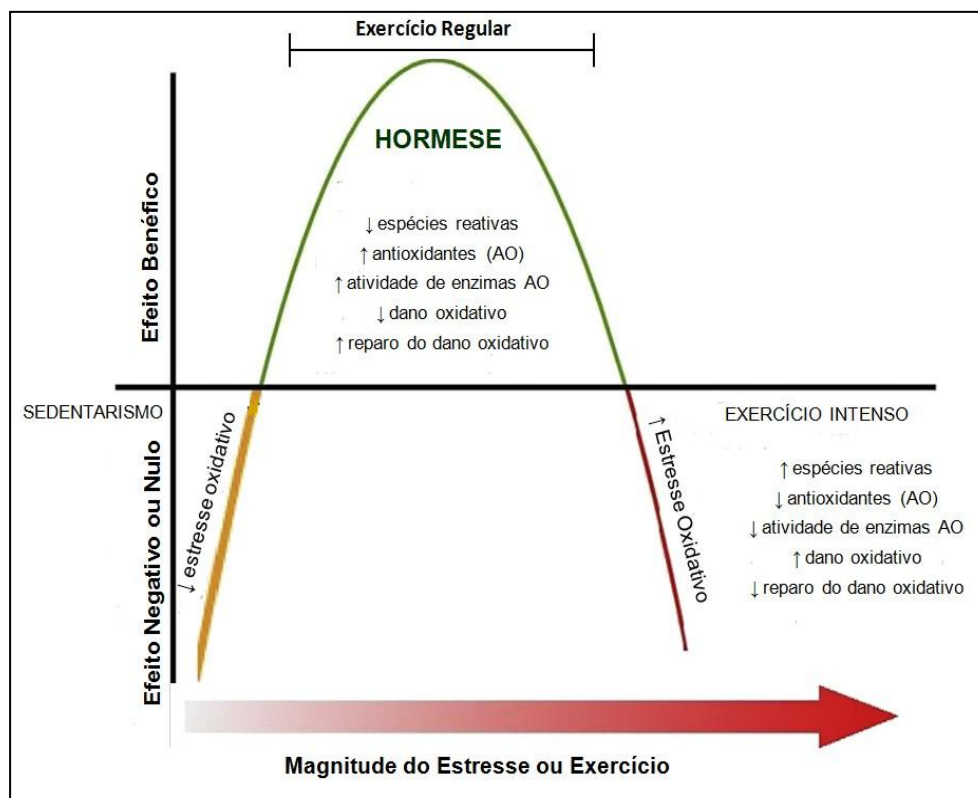
Várias evidências apoiam a ideia de que a atividade física pode compensar o declínio cognitivo que ocorre na idade adulta avançada (Raz *et al.*, 2005). Desta forma, dados de estudos epidemiológicos demonstraram que a atividade física está associada com a melhora da função cognitiva em indivíduos envelhecidos (Ahlskog *et al.*, 2011) e pode estar correlacionada com alterações estruturais no cérebro (Erickson *et al.*, 2009).

No estudo realizado por Van Praag e colaboradores (2005) foi relatado que camundongos envelhecidos que foram sedentários até os 18 meses de idade e então expostos ao exercício físico voluntário, apresentaram melhora significativa do desempenho cognitivo quando comparados aos controles de mesma idade. Kim e colaboradores (2010) também demonstraram que o exercício forçado de corrida em esteira ergométrica melhorou a memória de curta duração e a memória espacial em ratos senescentes pelo aumento da neurogênese e pela supressão da apoptose no giro denteado.

Outros estudos em roedores demonstram que o exercício físico facilita a aquisição e a retenção da memória em várias tarefas dependentes do hipocampo em animais jovens e envelhecidos, as quais incluem o labirinto

aquático de Morris (van Praag, 2009), a esQUIVA inibitória (Radák *et al.*, 2006) e o teste de reconhecimento de objetos (O'Callaghan *et al.*, 2007). Costa e colaboradores (2012) relataram que o exercício de corrida em esteira realizado uma vez por semana durante 8 semanas preveniu o declínio da memória de reconhecimento em ratos Wistar de meia-idade. Além disso, Cechetti e colaboradores (2012) mostraram que o exercício de corrida em esteira realizado 3 vezes por semana durante 12 semanas melhorou o aprendizado e a memória espacial e reduziu a lipoperoxidação após a hipoperfusão cerebral crônica em ratos.

O efeito da atividade física sobre o estado oxidativo celular é bastante complexo e depende de fatores como idade e sexo e também da intensidade e do tempo de duração do exercício (Pingitore *et al.*, 2015). Embora o exercício regular de intensidade moderada possa ser benéfico para reduzir o estresse oxidativo, o exercício aeróbico ou anaeróbico agudo e intenso está associado ao aumento da produção de espécies reativas em humanos (Radák *et al.*, 1999) e também em roedores (McArdle *et al.*, 2004). Sabe-se também que o exercício pode induzir o aumento do estresse oxidativo, mas esse estímulo parece ser necessário para promover a regulação das defesas antioxidantes endógenas pelo exercício (Pingitore *et al.*, 2015), conforme explicado pela teoria da Hormese (Figura 3). De acordo com esta teoria, o exercício físico regular está associado à redução de espécies reativas e ao aumento das defesas antioxidantes, reduzindo o dano oxidativo celular e promovendo ativação dos mecanismos de reparo em mamíferos (Vassalle *et al.*, 2015).



**Figura 3.** Hormese e exercício. O exercício regular promove a hormese, reduz o estresse oxidativo, protege contra o aparecimento e progressão de doenças, melhora o desempenho e a qualidade de vida. O exercício extenuante aumenta o estresse oxidativo e o risco de doenças. No entanto, um estado de estresse oxidativo que é muito baixo leva a uma falta de benefícios relacionados com hormese e pode ser prejudicial para a saúde. (Adaptado de Pingitore *et al.*, 2015).

Corroborando com a teoria da Hormese, Radák e colaboradores (2006) demonstraram uma redução na concentração de radicais livres no cérebro de ratos que foram submetidos ao exercício físico regular, enquanto outros estudos não observaram alterações na atividade de enzimas antioxidantes em estruturas cerebrais de ratos adultos submetidos ao exercício agudo e intenso (Acikgoz *et al.*, 2006; Aksu *et al.*, 2009).

A melhora da sinalização por **fatores tróficos** tem sido considerada uma das principais hipóteses para explicar os efeitos positivos da atividade física sobre a cognição em seres humanos, com a atenção centrada nas neurotrofinas (Salehi *et al.*, 2003; Salehi *et al.*, 2004). As neurotrofinas são compostas por uma família de polipeptídeos que regulam várias funções neuronais incluindo proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação. O **fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e a neurotrofina-3 (NT-3)** fazem parte desta família e são sintetizados por neurônios-alvo, inicialmente nas formas de pré e pró-proteínas, sendo suas ações mediadas pela ligação a duas classes diferentes de receptores (Curtis *et al.*, 1995; Villanueva, 2013).

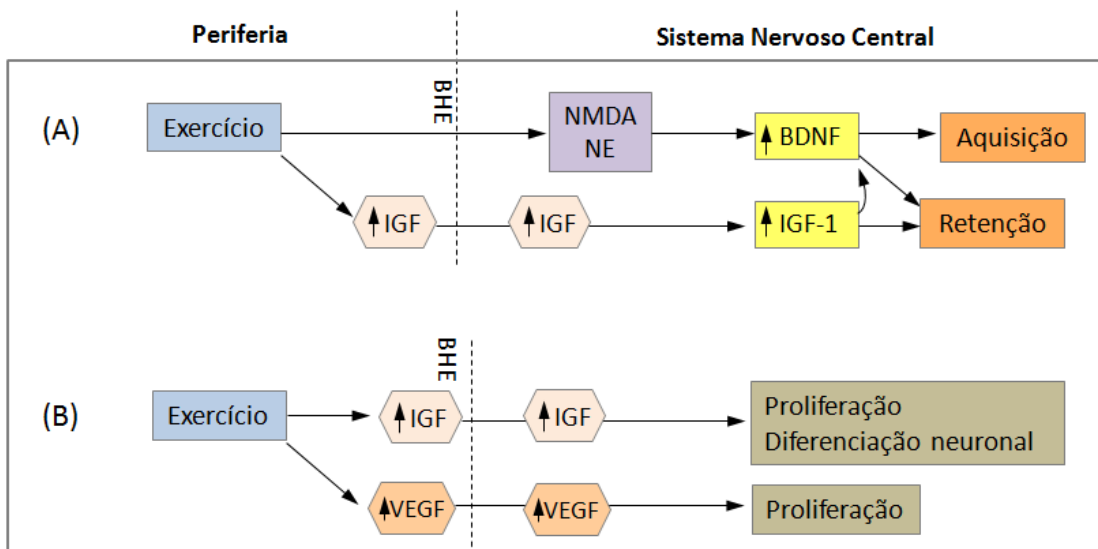
Evidências demonstram que a expressão de NT-3 está relacionada com a melhora da função cognitiva em roedores (Fischer *et al.*, 1994; Kaisho *et al.*, 1999). Neste sentido, foi observado que ratos envelhecidos que tiveram melhor desempenho na tarefa de memória de trabalho também apresentaram um aumento dos níveis de NT-3 no hipocampo (Bimonte *et al.*, 2003).

O BDNF está relacionado com o aumento da plasticidade sináptica (Lu e Chow, 1999; Nakata e Nakamura, 2007), com a indução e manutenção da fase tardia da potenciação de longa duração (Korte *et al.*, 1995), com a sobrevivência e a diferenciação neuronal (Reichardt, 2006) e com a proteção contra a morte de neurônios no hipocampo (Pringle *et al.*; 1996).

Alguns estudos têm demonstrado que tanto o exercício físico agudo quanto o regular podem aumentar os níveis periféricos de BDNF em indivíduos jovens e envelhecidos saudáveis (Coelho *et al.*, 2013; Szuhany *et al.*, 2015). Neste contexto, embora os mecanismos moleculares responsáveis pelo aumento dos níveis de BDNF em resposta ao exercício ainda não sejam totalmente compreendidos, estudos sugerem que esse aumento seja originado tanto de

fontes centrais quanto periféricas, sendo 70-80% do BDNF circulante derivado do cérebro e os níveis remanescentes derivados de fontes periféricas, como plaquetas, células B e T e monócitos (Rasmussen *et al.*, 2009).

Em modelos experimentais, tem sido demonstrado que o exercício físico, além de melhorar o desempenho comportamental, também facilita a plasticidade sináptica no hipocampo, uma estrutura-chave para a aprendizagem espacial (Cotman *et al.*, 2007). Várias evidências reforçam a ideia de que o BDNF é essencial para a função hipocampal, para a plasticidade e para o aprendizado (Kuipers e Bramham, 2006). Estudos em roedores demonstram que o exercício aumenta o BDNF em várias regiões do cérebro, especialmente no hipocampo, e que esse efeito do exercício pode ser observado até semanas após o seu término (Berchtold *et al.*, 2005). O aumento do BDNF hipocampal pelo exercício é mediado por sistemas de neurotransmissores (Russo-Neustadt e Chen, 2005), pelo sistema neuroendócrino (Cotman e Berchtold, 2002) e pelo **fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1)** (Ding *et al.*, 2006). Assim como o BDNF, a expressão do gene do IGF-1 é aumentada nos neurônios hipocampais em resposta ao exercício, permanecendo elevada mesmo após vários dias do seu término (Ding *et al.*, 2006). Os níveis de IGF-1 periférico circulantes são rapidamente aumentados em resposta ao exercício e parecem ser essenciais para a neurogênese (Trejo *et al.*, 2001) e para a facilitação da memória induzida pelo exercício em ratos (Ding *et al.*, 2006) (Figura 4).



**Figura 4.** Efeito do exercício sobre o aprendizado e a memória através da cascata de fatores de crescimento. (A) O exercício aumenta o aprendizado pela indução do BDNF e do IGF-1. Neurotransmissores, incluindo os receptores NMDA e o sistema noradrenérgico (NE), o IGF-1 periférico e central medeiam a indução do BDNF hipocampal com o exercício. (B) O exercício estimula a neurogênese no hipocampo através da interação entre os efeitos de IGF-1 e VEGF. IGF-1 e VEGF periféricos atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e promovem o aumento da proliferação e sobrevivência celular (**Adaptado de** Cotman *et al.*, 2007).

O IGF-1 é um importante fator trófico para o crescimento e para reações metabólicas. Os principais órgãos responsáveis pela síntese de IGF-1 incluem os músculos, o fígado e o cérebro; neste último o IGF-1 é sintetizado principalmente pelos macrófagos perivasculares e pela microglia (Carro *et al.*, 2000).

No estudo realizado por Trejo e colaboradores (2001) foi observado que a liberação periférica de IGF-1 é um dos fatores responsável por induzir a proliferação celular no giro dentado, pois a administração crônica do anticorpo anti-IGF-1 preveniu os efeitos positivos do exercício de corrida em esteira em ratos adultos. Neste estudo, também foi demonstrado que o exercício físico promoveu a captação de IGF-1 circulante pelo cérebro, bem como a neurogênese no hipocampo. Além disso, foi relatado que um dos vários efeitos



do exercício mediado pelo IGF-1 no cérebro é promover o aumento da expressão de BDNF no hipocampo. Em outro estudo, realizado por Ding e colaboradores (2006), foi observado que o bloqueio do receptor de IGF-1 durante o exercício em ratos preveniu a melhora da memória induzida pelo exercício, e também reverteu o aumento dos níveis de BDNF. Além desses efeitos, tem sido demonstrado que o IGF-1 periférico também é necessário para a remodelação dos vasos induzida pelo exercício físico no cérebro de roedores (Lopez-Lopez *et al.*, 2004).

Outro fator trófico que tem sido estudado como alvo dos efeitos do exercício físico é o fator de **crescimento endotelial vascular (VEGF)**. O VEGF é uma importante proteína com função neuroprotetora, responsável por regular a proliferação das células endoteliais, a angiogênese, e está fortemente envolvido com a neurogênese (Fabel *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que os efeitos da atividade física sobre o conteúdo de VEGF e sobre a expressão do seu RNA mensageiro parecem ser dose dependentes do exercício (Ding *et al.*, 2006).

Além da melhora da sinalização por fatores tróficos, os efeitos positivos do exercício físico sobre a cognição podem estar relacionados a outros mecanismos, como a regulação de enzimas-chave que também desempenham papel importante no processo de aprendizado e memória, como é o caso da Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e da AChE (Wyse *et al.*, 2004; Haider *et al.*, 2014). Apesar destas evidências, estes mecanismos ainda têm sido pouco explorados. Assim, torna-se importante investigar os efeitos do exercício físico sobre a atividade destas enzimas, buscando avaliar as possíveis correlações com o desempenho dos animais jovens e envelhecidos nas tarefas de aprendizado e memória.

Diante do exposto, a **hipótese de trabalho** desta tese é de que o exercício físico moderado pode prevenir o declínio de memória relacionado à idade e que este efeito pode estar associado com a redução do estresse oxidativo, com o aumento da expressão de fatores neurotróficos e com a atividade das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e AChE no hipocampo de ratos senescentes. Além disso, como o exercício atua no organismo como um todo, é possível que o músculo sóleo dos ratos senescentes responda de maneira diferente às alterações do estado oxidativo decorrentes do treinamento físico quando comparado ao músculo dos ratos jovens.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do exercício físico sobre a memória e sobre parâmetros bioquímicos e moleculares no hipocampo e no músculo esquelético de ratos senescentes.

### **2.1.1 Objetivos Específicos**

- I. Investigar o efeito do exercício físico moderado sobre a função cognitiva de ratos Wistar machos de 3 e 22 meses de idade através da memória de referência na tarefa de Water maze, bem como investigar os parâmetros de estresse oxidativo e a expressão de fatores neurotróficos no hipocampo;
- II. Avaliar o efeito do exercício físico moderado sobre a função cognitiva de ratos Wistar machos de 3, 6 e 22 meses de idade, bem como avaliar a atividade das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e AChE no hipocampo dos ratos após o treinamento cognitivo ou após o exercício físico combinado com o treinamento cognitivo;
- III. Estudar o efeito do exercício físico moderado sobre o estado oxidativo celular no músculo esquelético (sóleo) de ratos Wistar machos de 3 e 22 meses de idade.

### **3. CAPÍTULO I**

**Manuscrito:** Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats – submetido ao periódico *Behavioural Brain Research*

**Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats**

Cláudia Vanzella<sup>a</sup>, Juliana Dalibor Neves<sup>b</sup>, Adriana Vizuete<sup>a</sup>, Dirceu Aristimunha<sup>a</sup>, Janaína Kolling<sup>a</sup>, Aline Longoni<sup>a</sup>, Carlos Alberto Saraiva Gonçalves<sup>a</sup>, Angela Terezinha de Souza Wyse<sup>a</sup>, Carlos Alexandre Netto<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup>Post-Graduation Program of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

\* Corresponding Author: Cláudia Vanzella, Departamento de Bioquímica, Instituto das Ciências da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel/fax: +55-051-33085568.

E-mail address: [cvanzella@gmail.com](mailto:cvanzella@gmail.com)

## **Abstract**

Clinical and pre-clinical studies indicate that exercise is beneficial to many aspects of brain function especially during aging. The present study investigated the effects of a treadmill running protocol in young (3 month-old) and aged (22 month-old) male Wistar rats, on: I) cognitive function, as assessed by spatial reference memory in the Morris Water maze; II) oxidative stress parameters and expression of neurotrophic factors BDNF, NT-3, IGF-1 and VEGF in the hippocampus. Animals of both ages were assigned to sedentary (non-exercised) and exercised (20 min of daily running sessions, 3 times per week for 4 weeks) groups. Cognition was assessed by a reference memory task run in the Morris Water maze; twenty four hours after last session of behavioral testing hippocampi were collected for biochemical analysis. Results demonstrate that the moderate treadmill running exercise: I) prevented age-related deficits in reference memory in the Morris Water Maze; II) prevented the age-related increase of reactive oxygen species levels and lipid peroxidation in the hippocampus; III) caused an increase of BDNF, NT-3 and IGF-1 expression in the hippocampus of aged rats. These results suggest that both exercise molecular effects, namely the reduction of oxidative stress and the increase of neurotrophic factors expression in the hippocampus, might be related to its positive effect on memory performance in aged rats.

**Key Words:** Hippocampus, aged rats, treadmill running exercise, oxidative stress, neurotrophic facts, Morris Water maze task

**List of abbreviations:** BDNF: brain-derived neurotrophic factor; CAT: catalase, DCF: dichlorofluorescein, EXE: exercised, FGF-2: fibroblast Growth Factor 2, H<sub>2</sub>DCF: 2',7'-dichlorofluorescein, IGF-1: insulin-like growth factor-1, NT-3: neurotrophin-3, MDA: malondialdehyde, VO<sub>2</sub>: peak oxygen uptake, ROS: reactive oxygen species, SED: sedentary, SOD: superoxide dismutase, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, VEGF: vascular endothelial growth factor.

## 1. Introduction

Aging is a time-dependent process leading to anatomical and physical changes that reduce physiological activity of many organs [1, 2]. It is well known that aging is frequently associated with age-mediated structural and functional alterations in the hippocampus [3], i.e., decreases in cognitive performance that are associated to impairment of synaptic transmission, changes in neurotransmitter levels [4], as well as to the attenuation of hippocampal neurogenesis [5], aging is also associated, at the cellular level, with oxidative stress, impairment of mitochondrial function and DNA repair, and with decreased tissue regeneration activity [6]. The increase in reactive oxygen species may be a crucial contributor to brain senescence and neurodegeneration in aged rodents and humans [7, 8], and has been tentatively related to cognitive impairment. Free radicals cause oxidative damage to critical biological molecules and, in order to handle that, organisms utilize endogenous defenses, including antioxidant enzymes as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, as well as non-enzymatic antioxidants (as, for example, glutathione, ascorbate and tocopherol) [9]. These molecules provide support for aerobic cells to maintain a reducing state despite the oxidizing environment [10].

A number of trophic factors, important proteins for maintaining survival and function of neurons, have also shown neuroprotective/neurotrophic properties [11]. Interestingly, the levels of proteins such as vascular endothelial growth factor (VEGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and neurotrophin-3 (NT-3) are dynamically regulated in the brain [12, 13], as well as are positively related to the enhancement of cognitive function [14]. In addition, there is evidence on the importance of NT-3 expression for cognition during aging, especially in the hippocampus [15].

Numerous experimental approaches have been used with the aim of reducing age-related brain changes, and physical exercise has revealed many beneficial effects. Both voluntary and forced exercise have been used to investigate the effects of physical activity on brain function; however, it has been argued that forced exercise gives more consistent results since all subjects are submitted to the same experimental conditions [16]. Moderate and regular physical activity improves performance in different memory and learning tasks in aged and young rodents [17–20]. Moreover, previous studies show that exercise increases brain antioxidant capacity and reduces oxidative stress [18, 21, 22]. It was also reported that exercise increases the expression and levels of several neurotrophic and growth factors, including IGF-1 [23], fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2) [24] and BDNF [25]. Indeed, it is well known that the beneficial effects of physical exercise on brain function are mediated by both BDNF and IGF-1 [14, 23]; however, little is known about exercise effects on brain NT-3



expression.

The present study investigated the effect of a moderate treadmill running exercise protocol in young and aged Wistar rats on: I) cognitive function, as assessed by spatial reference memory in the Morris Water maze; II) oxidative stress parameters, namely the reactive oxygen species, lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase activities and expression of neurotrophic factors BDNF, NT-3, IGF-1 and VEGF in the hippocampus. The working hypothesis is that treadmill running exercise will prevent aged-related memory deficits, and that such effect is possibly associated to a reduction of oxidative stress and to increased expression of neurotrophic factors in the hippocampus of aged rats.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals*

Young (3 months-old) and aged (22 months-old) male Wistar rats were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. They were maintained in a temperature controlled room ( $22 \pm 1$  °C), on a 12/12 h light/dark cycle, with food and water available *ad libitum*. The NIH "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH publication No. 80-23, revised 1996) and the official governmental guidelines, in compliance with the Federação das Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental, were followed in all experiments. The aged animals were housed three per cage. The study was approved by the Ethics Committee of the University under protocol number 24199.

### *2.2. Exercise training*

Rats were habituated with the treadmill apparatus to minimize novelty stress and randomly divided into sedentary (SED, non-exercised) and exercised (EXE, 20 min of daily running sessions, 3 times per week for 4 weeks) groups. The exercise training consisted of running sessions in an adapted motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) at 60% of the animals' maximal oxygen uptake [26]. Peak oxygen uptake ( $VO_2$ ) was measured indirectly in all animals before training, as follows. Each rat ran at a low initial speed on the treadmill; the speed was increased by 5m/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 exercise capacity, which was in turn taken as  $VO_2$  max [26, 27].

The protocol of exercise was of daily 20 minutes running sessions, three times per week for 4 weeks [28, 29]. Any animal that refused to run was encouraged by gently tapping

on the back. Sedentary rats were handled exactly as the experimental animals and were left on the treadmill for 5 min without any stimulus to run. All procedures occurred between 7 and 12 am. The experimental design is shown in figure 1. The number of animals per group was: SED young= 11; EXE young= 11; SED aged= 10 and EXE aged= 10.

### *2.3. Reference Memory Assessment*

Hippocampus-dependent spatial learning and memory were assessed using the Morris Water maze. The maze consisted of a black circular pool with 200 cm in diameter filled with water (temperature around 23 °C, depth 40 cm) situated in a room with visual cues on the walls. A transparent platform with 10 cm in diameter was submerged in the water (2 cm below the water surface) and the pool was conceptually divided into four quadrants and had four points designated as starting positions (N, S, W or E) [30, 31].

Twenty four hours after the last exercise session rats were submitted to the reference memory task. Rats were trained on 5 consecutive days, receiving 4 trials per day, and 24 h after the last training session a probe trial was performed. Each daily session consisted of four trials with a 10 min intertrial interval. A trial began when the rat was placed in the water at one of the four starting positions, chosen at random, facing the wall. The order of starting position varied in every trial and any given sequence was not repeated on acquisition phase days. The rat was given 60 s to locate the platform; if the animal did not succeed it was gently guided to the platform and left on it for 10 s. Rats were dried and returned to their home cages after each trial. The latency to find the platform was measured in each trial and the mean latency for every training day was calculated. The probe consisted of a single trial with the platform removed. Here, the latency to find the original platform position, the time spent in the target and in the opposite quadrants were analyzed [31–33].

### *2.4. Tissue preparation*

Twenty four hours after last session of behavioral assessment, animals were euthanized by decapitation without anesthesia. The brain was rapidly removed and the hippocampus was quickly dissected out on a glass dish over ice. To assess the reactive oxygen species levels, superoxide dismutase and catalase activities the hippocampus was homogenized in 10 volumes (1:10, w/v) of 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 containing 140 mM KCl. The homogenates were then centrifuged at 800 ×g for 10 min at 4 °C and the supernatant was used for assays. To determine the levels of TBARS, the hippocampus was homogenized in a Pyrex tube 1:10 (w/v) in 1.15% KCl. Homogenates were centrifuged at 800 ×g for 10 min at 4 °C and the supernatant was used for the assay. The number of animals per

group was: SED young= 5-6; EXE young= 5-6; SED aged= 5 and EXE aged= 5.

### 2.5. Reactive oxygen species (ROS)

ROS production was measured according to the method of LeBel and colleagues [34] and based on the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein (H<sub>2</sub>DCF). The sample was incubated in a medium containing 100 μM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) solution. The reaction produces the fluorescent compound dichlorofluorescein (DCF) which is measured at  $\lambda_{em}$ =488 nm and  $\lambda_{ex}$ =525 nm; results are presented as nmol DCF/mg protein.

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

TBARS, an index of lipid peroxidation, was determined according to the method described by Ohkawa and colleagues (1979) [35]. Hippocampus supernatants in 1.15% KCl were mixed with 20% trichloroacetic acid and 0.8% thiobarbituric acid and heated in a boiling water bath for 60 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm and calculated as nmol of malondialdehyde (MDA) formed per milligram of protein.

### 2.7. Superoxide dismutase (SOD) activity

The SOD activity assay is based on the capacity of pyrogallol to autoxidize, a process highly dependent on superoxide, the substrate for SOD. The inhibition of autoxidation of this compound occurs in the presence of SOD, whose activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically at 420 nm [36]. A calibration curve was performed with purified SOD as standard, in order to calculate the activity of SOD present in the samples. Results were reported as units per milligram of protein. SOD activity was expressed as the amount of enzyme that inhibits the oxidation of epinephrine by 50%, which is equal to 1 unit.

### 2.8. Catalase (CAT) activity

CAT activity was assayed using a double-beam spectrophotometer with temperature control (Hitachi U-2001). This method is based on the disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, and 0.1–0.3 mg protein/mL [37]. One CAT unit is defined as 1 mmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumed per minute and the specific activity is represented as CAT units/mg protein.

### 2.9. Protein determination

Protein was measured by the method of Lowry and colleagues [38] using bovine serum albumin as standard.

### 2.10. Western Blotting

Tissue was homogenized in lysis buffer containing 50 mM of Tris-HCl, 4% SDS, and EDTA 2mM; boiled and added 25% of a solution containing 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 40% glycerol, and 0,02% bromophenol blue. Equal protein concentrations (20  $\mu$ g/lane, determined by Lowry method [38]) were put onto 12% SDS-PAGE (Mini-PROTEAN, Bio-Rad – 1658004) and subsequently transferred to nitrocellulose membrane (Trans-blot SD semi-dry transfer cell, Bio-Rad –1703940) for 1 h in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol). The nitrocellulose membranes were washed for 10 min in Tris-buffered saline (TBS; 0.5 M NaCl, 30 mM Trizma, pH 7.5), followed by incubation overnight at 4°C in blocking solution (TBS plus 2% bovine serum albumin and 0.05% Tween 20). After incubation, the blot was washed three times for 5 min with TBS plus 0.05% Tween-20 (T-TBS), and then incubated overnight at 4 °C in blocking solution containing the antibody: anti-VEGF (sc-507, 1:1000, Santa Cruz), anti- BDNF (ab27932, 1:1000, Abcam), anti-NT-3 (ab65804, 1:1000, Abcam), anti-IGF-I (#05-172, 1:1000, Millipore) and anti-actin (1:2000, Sigma). The blot was then washed three times for 5 min with T-TBS and incubated for 1 h at room temperature in solution containing horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (#AP132P, 1:10000, Millipore), HRP anti-mouse IgG (#AP124P, 1:10000, Millipore) (GE Healthcare, Sao Paulo—Brazil). The blot was washed again three times for 10 min with T-TBS and once for 10 min with TBS. The chemiluminescence signal was detected using an ECL Kit (GE Life Sciences - RPN2109). Immunoblots were quantified by scanning the membranes in Image Quant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences - United Kingdom) and determining optical densities through Image Studio Lite V5.0 (LI-COR Biosciences – US). The number of animals per group was: SED young= 4-6; EXE young= 4-6; SED aged= 5 and EXE aged= 4-5.

### 2.11. Statistical analysis

Latencies in the Morris Water maze task were analyzed using two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA), with aging and exercise as independent variables and session as the repeated measure. Results of ROS levels, TBARS, SOD/CAT activity ratio and western blotting were analyzed by two-way ANOVA or one-way ANOVA, whenever appropriate, followed by Duncan's *post hoc* test. Values are expressed as mean  $\pm$  standard error (S.E.). Significance was assumed whenever  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Reference memory in the Morris Water maze

SED aged rats showed a reference memory acquisition deficit, requiring more time to find the platform in the 5<sup>th</sup> day of training ( $41.24 \pm 1.91$  seconds) than the SED young rats ( $17.66 \pm 1.77$  seconds), (Fig. 2;  $F_{(1,42)} = 18.468$ ,  $p < 0.05$ ). Exercise was able to prevent such memory impairment, since the latency of EXE aged group to find the platform ( $24.3 \pm 2.94$  seconds) was not different from that of SED young group. However, both aged groups (SED =  $43.4 \pm 3.76$ , and EXE =  $39.9 \pm 5.74$ ) differed from the SED young group (control,  $21.45 \pm 1.81$ ) in the time to find the platform area ( $F_{(1,42)} = 23.01$ ,  $p < 0.05$ ) in the probe trial.

The mean of swimming speed was of  $0.47 \pm 0.0016$  cm/s for control animals (SED young rats) and  $0.86 \pm 0.002$  cm/s for SED aged rats ( $F_{(1,40)} = 3.235$ ,  $p > 0.05$ ), demonstrating that aging did not cause any gross motor deficit. The general mean of swim speed was  $0.59 \pm 0.001$  cm/s for all animals.

#### 3.2. Oxidative stress parameters

As predicted, SED aged rats showed an increase in ROS levels in the hippocampus when compared to the SED young group (Fig. 3A;  $F_{(1,22)} = 66.66$ ,  $p < 0.05$ ); the exercise protocol was able to prevent such increase in the EXE aged, but not in EXE young, group ( $F_{(1,22)} = 19.40$ ,  $p < 0.05$ ). Interestingly, a positive correlation was found between ROS content in the hippocampus and the time to find the platform in the 5<sup>th</sup> day of training in Water Maze task ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.05$ ), demonstrating that the increase in ROS levels is probably associated to the memory impairment in aged rats.

The investigation of lipid peroxidation revealed an increase in TBARS levels in the hippocampus of SED aged animals when compared to SED young group (Fig. 3B;  $F_{(1,19)} = 7.00$ ,  $p < 0.05$ ). Although the exercise protocol reduced the lipid peroxidation in the hippocampus of EXE aged rats ( $F_{(1,19)} = 9.74$ ,  $p < 0.05$ ), it did not affect young exercised rats. There were also positive correlations between the lipid peroxidation and the ROS content ( $r = 0.67$ ,  $p < 0.05$ ), and with the time to find the platform in the 5<sup>th</sup> day of training in Water Maze task ( $r = 0.62$ ,  $p < 0.05$ ), showing that the decrease in oxidative stress, i.e. reduction of ROS levels and lipid peroxidation, might be associated with the exercise-related memory improvement. The effects of aging and exercise on the antioxidant brain enzymes are presented in Fig. 3C. There was no difference on [SOD]/[CAT] activity ratios between groups.

### 3.3. Western blotting

Western blotting was performed to assess the expression of neurotrophic factors in the hippocampus (Fig. 4). There was no effect of aging in the expression of BDNF in the hippocampus, however the exercise was able to increase its expression in the EXE aged, but not in EXE young, group when compared to the SED young group (Fig. 4A;  $F_{(1,21)} = 4.23$ ,  $p < 0.05$ ). Similarly, there was no effect of aging on the expression of NT-3 in the hippocampus, though the exercise increased the expression of this protein in the EXE aged group when compared to the SED young group (Fig. 4B;  $F_{(1,17)} = 6.10$ ,  $p < 0.05$ ), with no effect on the expression of NT-3 in the EXE young rats.

The trophic factors IGF-1 and VEGF were also studied. The results showed effects of aging and of exercise on the increased expression of IGF-1 in the hippocampus (Fig. 4C;  $F_{(1,22)} = 6.00$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{(1,22)} = 11.36$ ,  $p < 0.05$ ; respectively). In fact, the EXE aged group was different from all other tested groups. On the other hand, no effect was observed in the EXE young group; and there was no effect of aging or exercise on the VEGF expression in the hippocampus of young and aged rats (Fig. 4D;  $F_{(1,21)} = 2.62$ ,  $p = 0.087$ ).

## 5. Discussion

The present study investigated the effects of a moderate treadmill running exercise protocol on spatial learning and memory, ROS levels, lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase activities and the expression of neurotrophic factors in the hippocampus of young and aged male Wistar rats. Consistent with the working hypothesis, running exercise prevented the age-related reference memory deficit, an effect possibly associated to the demonstrated reduction of oxidative stress together with the increased expression of BDNF, NT-3 and IGF-1 in the hippocampus. Additionally, there were robust correlations between the reduction in oxidative status by exercise, i.e. decreased in ROS levels and lipid peroxidation in the hippocampus of aged rats, and the performance in the reference memory task.

Cognitive function of rats was assessed by Morris Water maze task, a hippocampus-dependent spatial learning test [33]. Confirming previous reports [39, 40], present data demonstrate that aged rats showed acquisition deficit of reference memory when compared to young animals. As expected, the moderate treadmill running exercise was able to prevent the aged-related cognitive deficit, improving the performance of aged rats in this task. In agreement with that, Sampedro-Piquero and colleagues [41] showed that running exercise on a rotarod during 2 months improved spatial memory in aged rats, and another study demonstrated that 12 weeks of treadmill running improved recognition and aversive memory in aged rats [42]. However, in the probe trial both aged groups differed from control rats (SED

young group) in the time to find the platform area, which demonstrates that the exercise protocol here used improved memory acquisition, but did not affect memory retention.

Considering available evidence of hippocampus oxidative stress parameters and neurotrophic factors activity on cognition, we investigated whether the positive effect of physical exercise on age-related memory impairment performance could be associated to such variables. Oxidative stress, an imbalance between free radical production and antioxidant defense activity, may be associated with a range of degenerative diseases observed during aging, including those related to learning and memory deficits [43, 44]. Figure 3 shows an increase in ROS levels in the hippocampus of aged rats, which are in accordance with data from literature [45, 46]. Interestingly, treadmill running exercise was able to reduce the levels of these radicals in the hippocampus of aged animals, which may have contributed to improve memory performance since there was a positive correlation between ROS content and the time to find the platform in the 5<sup>th</sup> day of training in Water Maze task. It is well known that oxidative stress may lead to lipid peroxidation, and TBARS seems to be a good marker for its evaluation [45, 47]. Here, TBARS levels in the hippocampus of aged rats were increased when compared to that of young rats, indicating an age-related increase in lipid peroxidation. In agreement with such results, other authors also demonstrated that this parameter was markedly increased in aged rats [45, 48]. On the other hand, moderate treadmill running exercise reduced lipid peroxidation in the hippocampus of aged rats. In addition, there was a positive correlation between the hippocampus lipid peroxidation and the ROS levels, as well as with the time to find the platform in the 5<sup>th</sup> day of training in Water Maze task, showing that the decrease in oxidative stress, i.e. reduction of ROS levels and lipid peroxidation, might be associated with the exercise-related memory improvement. Surprisingly, SOD/CAT activity ratio was not altered by either aging or exercise, suggesting that the observed reduction in oxidative damage is due to action of exercise by different pathways.

Neurotrophic factors are important proteins involved in the maintenance of cell survival and differentiation, synaptic strengthening, increased resistance to oxidative stress and memory [49–51]. As shown in figure 4, treadmill running exercise increased the expression of BDNF, NT-3 and IGF-1 in the hippocampus of aged rats, but not of VEGF. Accordingly, studies have demonstrated that exercise may modulate the expression of neurotrophic factors even when initiated late in life [19]. Besides, studies have showed that both BDNF and IGF-1 signaling are crucial mechanisms underlying improved learning in response to exercise [14, 52]. In addition, it was shown that the role played by IGF-1 during exercise may be associated with the action of BDNF since, like BDNF; its receptors are abundant in the hippocampus [53–55]. Figure 4B demonstrates the effect of exercise on NT-3 expression. Interestingly, treadmill

running exercise significantly increased the expression of NT-3 in aged rats. NT-3, a close relative to BDNF in the neurotrophin family [56], has shown to play an important role in ameliorating aging-related cognitive deficits [15, 57]. In this context, it was reported that the overexpression of NT-3 in mice prevented age-related spatial learning impairments [57] and that the intracerebroventricular infusion of this neurotrophin improved spatial learning in aged rats [58]. However, to the best of our knowledge, this is the first study to show that exercise is able to increase the expression of NT-3 in aged rats, suggesting that the upregulation of neurotrophic factors is a key mechanism through which exercise improved memory performance.

Summarizing, present study demonstrates that moderate treadmill running exercise: I) prevented age-related deficit in the Morris Water Maze reference memory task; II) prevented the age-related increase of reactive oxygen species levels and lipid peroxidation in the hippocampus; III) increased the expression of BDNF, NT-3 and IGF-1 in the hippocampus. These results suggest that both exercise molecular effects, namely the reduction of oxidative stress and the increase of neurotrophic factors expression in the hippocampus, might be related to its positive effect on memory performance in aged rats, thus reinforcing the importance of physical exercise as a non-pharmacological therapeutic/preventive strategy for cognitive decline related to aging.

### **Acknowledgements**

This research was partially supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

### **References**

- [1] T. Farooqui, A.A. Farooqui, Aging: An important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Mech. Ageing Dev.* 130 (2009) 203–215. doi:10.1016/j.mad.2008.11.006.
- [2] C.W. Hung, Y.C. Chen, W.L. Hsieh, S.H. Chiou, C.L. Kao, Ageing and neurodegenerative diseases, *Ageing Res. Rev.* 9S (2010) S36–S46. doi:10.1016/j.arr.2010.08.006.
- [3] E.S. Rosenzweig, C.A. Barnes, Impact of aging on hippocampal function: Plasticity, network dynamics, and cognition, *Prog. Neurobiol.* 69 (2003) 143–179. doi:10.1016/S0301-0082(02)00126-0.
- [4] M. Nieto-Sampedro, M. Nieto-Díaz, Neural plasticity: Changes with age, *J. Neural Transm.* 112 (2005) 3–27. doi:10.1007/s00702-004-0146-7.
- [5] K. Fabel, K. Fabel, B. Tam, D. Kaufer, A. Baiker, N. Simmons, C.J. Kuo, T.D. Palmer, VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis, *Eur. J. Neurosci.* 18 (2003) 2803–2812. doi:10.1111/j.1460-9568.2003.03041.x.
- [6] E. Sahin, R.A. DePinho, Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing, *Nature.* 464 (2010) 520–528. doi:10.1038/nature08982.
- [7] L.K. Gilmer, M.A. Ansari, K.N. Roberts, S. Scheff, Age-related changes in mitochondrial



- respiration and oxidative damage in the cerebral cortex of the Fischer 344 rat, *Mech. Ageing Dev.* 131 (2010) 133–143. doi:10.1016/j.mad.2009.12.011.
- [8] A. Navarro, C. Gomez, J.M. López-Cepero, A. Boveris, Navarro 2004, *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286 (2004) 505–511.
- [9] B. Halliwell, Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease, *Am. J. Med.* 91 (1991) 14S–22S.
- [10] C. Pogocky, D.; Schöneich, Thuy radicals abstract hydrogen atoms from carbohydrates: reactivity and selectivity, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 98–107.
- [11] D. Tripathy, A. Sanchez, X. Yin, J. Martinez, P. Grammas, Age-related decrease in cerebrovascular-derived neuroprotective proteins: Effect of acetaminophen, *Microvasc. Res.* 84 (2012) 278–285. doi:10.1016/j.mvr.2012.08.004.
- [12] G.P. Cortese, R.M. Barrientos, S.F. Maier, S.L. Patterson, Aging and a Peripheral Immune Challenge Interact To Reduce mBDNF and Activation of TrkB, PLC $\gamma$ 1, and ERK in Hippocampal Synaptoneurosomes, *J. Neurosci.* 31 (2011) 4274–4279. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012. Investigations.
- [13] F. Gomez-Pinilla, S. Vaynman, Z. Ying, Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition, *Eur. J. Neurosci.* 28 (2008) 2278–2287. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06524.x.
- [14] S. Vaynman, Z. Ying, F. Gomez-Pinilla, Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition, *Eur. J. Neurosci.* 20 (2004) 2580–2590. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03720.x.
- [15] H.A. Bimonte, M.E. Nelson, A.C.E. Granholm, Age-related deficits as working memory load increases: Relationships with growth factors, *Neurobiol. Aging.* 24 (2003) 37–48. doi:10.1016/S0197-4580(02)00015-5.
- [16] A. Moraska, T. Deak, R.L. Spencer, D. Roth, M. Fleshner, Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279 (2000) R1321-9.
- [17] C.W. Bertchold, N.C.; Castello, N.; Corman, Exercise and time-dependent benefits to learning and memory, *Neuroscience.* 167 (2010) 588–597.
- [18] Z. Radak, A. Toldy, Z. Szabo, S. Siamilis, C. Nyakas, G. Silye, J. Jakus, S. Goto, The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain, *Neurochem. Int.* 49 (2006) 387–392. doi:10.1016/j.neuint.2006.02.004.
- [19] H. Van Praag, T. Shubert, C. Zhao, F.H. Gage, Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice, *J. Neurosci.* 25 (2005) 8680–8685.
- [20] G.A. Lovatel, V.R. Elsner, K. Bertoldi, C. Vanzella, F. dos S. Moysés, A. Vizueté, C. Spindler, L.R. Cechinel, C.A. Netto, A.R. Muotri, I.R. Siqueira, Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, Neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus, *Neurobiol. Learn. Mem.* 101 (2013) 94–102. doi:10.1016/j.nlm.2013.01.007.
- [21] S. Falone, A. D’Alessandro, A. Mirabilio, G. Petruccielli, M. Cacchio, C. Di Ilio, S. Di Loreto, F. Amicarelli, Long term running biphasically improves methylglyoxal-related metabolism, redox homeostasis and neurotrophic support within adult mouse brain cortex, *PLoS One.* 7 (2012) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0031401.
- [22] A. Navarro, A. Boveris, Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging., *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287 (2004) R1244–R1249. doi:10.1152/ajpregu.00226.2004.
- [23] J.L. Trejo, E. Carro, I. Torres-Alemá, Circulating Insulin-Like Growth Factor I Mediates Exercise-Induced Increases in the Number of New Neurons in the Adult Hippocampus, *J. Neurosci.* 21 (2001) 1628–1634.
- [24] F. Gómez-Pinilla, D. Lan, S. Vannarith, Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus, *Brain Res.* 764 (1997) 1–8. doi:10.1016/S0006-8993(97)00375-2.
- [25] A.A. Russo-Neustadt, H. Alejandre, C. Garcia, A.S. Ivy, M.J. Chen, Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor Expression Following Treatment with Reboxetine, Citalopram, and Physical Exercise, *Neuropsychopharmacology.* 29 (2004) 2189–2199.

doi:10.1038/sj.npp.1300514.

- [26] G.A. Brooks, T.P. White, Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise, *J. Appl. Physiol.* 45 (1978) 1009–1015.
- [27] R.M. Arida, F.A. Scorza, N.F. dos Santos, C.A. Peres, A. Cavalheiro, Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats, *Epilepsy Res.* 37 (1999) 45–52.
- [28] J. Ben, F.M.S. Soares, F. Cechetti, F.C. Vuaden, C.D. Bonan, C.A. Netto, A.T.S. Wyse, Exercise effects on activities of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats, *Brain Res.* 1302 (2009) 248–255. doi:10.1016/j.brainres.2009.09.013.
- [29] F. Cechetti, P.V. Worm, V.R. Elsner, K. Bertoldi, E. Sanches, J. Ben, I.R. Siqueira, C.A. Netto, Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat, *Neurobiol. Learn. Mem.* 97 (2012) 90–96. doi:10.1016/j.nlm.2011.09.008.
- [30] R. Morris, Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat, *J. Neurosci. Methods.* 11 (1984) 47–60. doi:10.1016/0165-0270(84)90007-4.
- [31] L.O. Pereira, N.S. Arteni, R.C. Petersen, A.P. da Rocha, M. Achaval, C.A. Netto, Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat, *Neurobiol. Learn. Mem.* 87 (2007) 101–108. doi:10.1016/j.nlm.2006.07.003.
- [32] F. Cechetti, P. V. Worm, L.O. Pereira, I.R. Siqueira, C.A. Netto, The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 43 (2010) 1178–1183. doi:10.1590/S0100-879X2010007500124.
- [33] C.A. Netto, H. Hodges, J.D. Sinden, E. Le Peillet, T. Kershaw, P. Sowinski, B.S. Meldrum, J.A. Gray, Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze, *Neuroscience.* 54 (1993) 69–92. doi:10.1016/0306-4522(93)90384-R.
- [34] C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy, Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 227–231. doi:10.1021/tx00026a012.
- [35] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* 95 (1979) 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- [36] S.L. Marklund, Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 148 (1985) 129–134. doi:10.1016/0027-5107(85)90216-7.
- [37] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- [38] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [39] D.J. Socci, P.R. Sanberg, G.W. Arendash, Nicotine Enhances Morris Water Maze Performance of Young and Aged Rats, *Neurobiol. Aging.* 16 (1995) 857–860.
- [40] N.M. Taridi, N.A. Rani, A.A. Latiff, W.Z.W. Ngah, M. Mazlan, Tocotrienol Rich Fraction Reverses Age-Related Deficits in Spatial Learning and Memory in Aged Rats, *Lipids.* 49 (2014) 855–869. doi:10.1007/s11745-014-3919-2.
- [41] P. Sampedro-Piquero, C. Zancada-Menendez, A. Begega, M. Mendez, J.L. Arias, Effects of forced exercise on spatial memory and cytochrome c oxidase activity in aged rats, *Brain Res.* 1502 (2013) 20–29. doi:10.1016/j.brainres.2012.12.036.
- [42] M.F. Flôres, A. Martins, H.L. Schmidt, F.W. Santos, I. Izquierdo, P.B. Mello-Carpes, F.P. Carpes, Effects of green tea and physical exercise on memory impairments associated with aging, *Neurochem. Int.* 78 (2014) 53–60. doi:10.1016/j.neuint.2014.08.008.
- [43] K. Fukui, K. Onodera, T. Shinkai, S. Suzuki, S. Urano, Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems.,

- Ann. N. Y. Acad. Sci. 928 (2001) 168–75. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb05646.x.
- [44] F. Serrano, E. Klann, Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus, *Ageing Res. Rev.* 3 (2004) 431–443. doi:10.1016/j.arr.2004.05.002.
- [45] I.R. Siqueira, C. Fochesatto, A. De Andrade, M. Santos, M. Hagen, A. Bello-Klein, C.A. Netto, Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain, *Int. J. Dev. Neurosci.* 23 (2005) 663–671. doi:10.1016/j.ijdevneu.2005.03.001.
- [46] H.R. Song, J.J. Cheng, H. Miao, Y.Z. Shang, Scutellaria flavonoid supplementation reverses ageing-related cognitive impairment and neuronal changes in aged rats, *Brain Inj.* 23 (2009) 146–153. doi:10.1080/02699050802649670.
- [47] S.W. Lee, G.D. Clemenson, F.H. Gage, New neurons in an aged brain, *Behav. Brain Res.* 227 (2012) 497–507. doi:10.1016/j.bbr.2011.10.009.
- [48] S. Haider, S. Saleem, T. Perveen, S. Tabassum, Z. Batool, S. Sadir, L. Liaquat, S. Madiha, Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system., *Age (Omaha)*. 36 (2014) 1291–1302. doi:10.1007/s11357-014-9653-0.
- [49] Z.H. Guo, M.P. Mattson, Neurotrophic factors protect cortical synaptic terminals against amyloid and oxidative stress-induced impairment of glucose transport, glutamate transport and mitochondrial function., *Cereb. Cortex.* 10 (2000) 50–7. doi:10.1093/cercor/10.1.50.
- [50] P. Leeds, Y. Leng, E. Chalecka-Franaszek, D.-M. Chuang, Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons, *Neurochem. Int.* 46 (2005) 61–72. doi:10.1016/j.neuint.2004.07.001.
- [51] S. Klumpp, D. Kriha, G. Bechmann, A. Maaßen, S. Maier, S. Pallast, P. Hoell, K. Josef, Phosphorylation of the growth factors bFGF, NGF and BDNF: A prerequisite for their biological activity, *Neurochem. Int.* 48 (2006) 131–137. doi:10.1016/j.neuint.2005.08.009.
- [52] Q. Ding, S. Vaynman, M. Akhavan, Z. Ying, F. Gomez-Pinilla, Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function, *Neuroscience.* 140 (2006) 823–833. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.02.084.
- [53] N.J. Bohannon, E.S. Corp, B.J. Wilcox, D.P. Figlewicz, D.M. Dorsa, D.G. Baskin, Localization of binding sites for insulin-like growth factor-I (IGF-I) in the rat brain by quantitative autoradiography, *Brain Res.* 444 (1988) 205–213. doi:0006-8993(88)90931-6 [pii].
- [54] D.M. Araujo, P.A. Lapchak, B. Collier, J.-G. Chabot, R. Quirion, Insulin-like growth factor-1 (somatomedin-C) receptors in the rat brain: distribution and interaction with the hippocampal cholinergic system, *Brain Res.* 484 (1989) 130–138. doi:10.1016/0006-8993(89)90355-7.
- [55] C. Bondy, H. Werner, C.T. Roberts Jr., D. LeRoith, Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II, *Neuroscience.* 46 (1992) 909–923. doi:0306-4522(92)90193-6 [pii].
- [56] H.M. Koo, M. Lee, M.H. Kim, Spontaneous Wheel Running Exercise Induces Brain Recovery via Neurotrophin-3 Expression Following Experimental Traumatic Brain Injury in Rats, *J. Phys. Ther. Sci.* 25 (2013) 1103–1107.
- [57] Y. Kaisho, H. Ohta, M. Miyamoto, K. Igarashi, Nerve growth factor promoter driven neurotrophin-3 overexpression in the mouse and the protective effect of transgene on age-related behavioral deficits, *Neurosci. Lett.* 277 (1999) 181–184. doi:10.1016/S0304-3940(99)00874-5.
- [58] W. Fischer, A. Sirevaag, S.J. Wiegand, R.M. Lindsay, A. Björklund, Reversal of spatial memory impairments in aged rats by nerve growth factor and neurotrophins 3 and 4/5 but not by brain-derived neurotrophic factor., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 8607–11.

### Legends to Figures

Figure 1. Diagram showing the timeline of experimental design. The treadmill running exercise protocol (20 min/day, 3 times per week during 28 days) was used. Morris Water maze training started 24 hours after the last session of treadmill exercise and was performed during 5 days, followed by the probe trial. Rats were euthanized twenty four after behavioral assessment and the hippocampus was dissected out for biochemical analysis.

Figure 2. Effect of aging and treadmill running exercise on the latency to find the platform during the five training sessions in the Reference Memory task in the Morris Water maze (n= 10-11 animals per group). Data are expressed as means and were analyzed by repeated measures ANOVA followed by Duncan's *post hoc* test. The Standard Error Mean, SEM bar, shows the mean of standard errors for all groups/days. Values were considered significant when  $p < 0.05$ . \* significantly different from the control group (young SED rats).

Figure 3. Effect of aging and treadmill running exercise on free oxygen species content (A), on lipid peroxidation (B) and on [SOD]/[CAT] activity ratio (C) in the hippocampus of rats (n= 5-6 animals per group). Results are expressed as percentage of control group (SED young group, mean  $\pm$  SE) and were analyzed by Two-way ANOVA followed by Duncan. \*= values significantly different from SED young group;  $*p < 0.05$ . #= values significantly different from SED young and SED aged group;  $*p < 0.05$ .

Figure 4. Effect of aging and treadmill running exercise on BDNF (A), NT-3 (B), IGF-1 (C) and on VEGF expression (D) in the hippocampus of rats (n= 4-6 animals per group). Results are expressed as percentage of control group (SED young group, mean  $\pm$  SE) and were analyzed by Two-way ANOVA followed by Duncan. \*= values significantly different from SED young group;  $*p < 0.05$ . #= values significantly different from EXE young group and SED aged group;  $*p < 0.05$ .

Figure 1

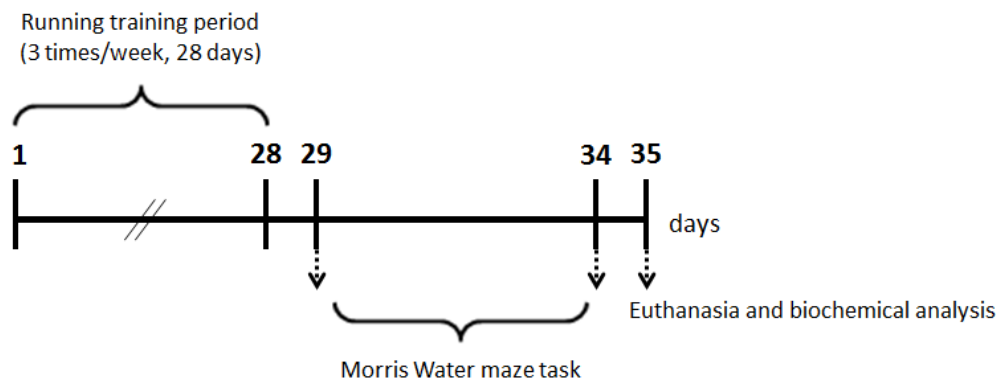


Figure 2

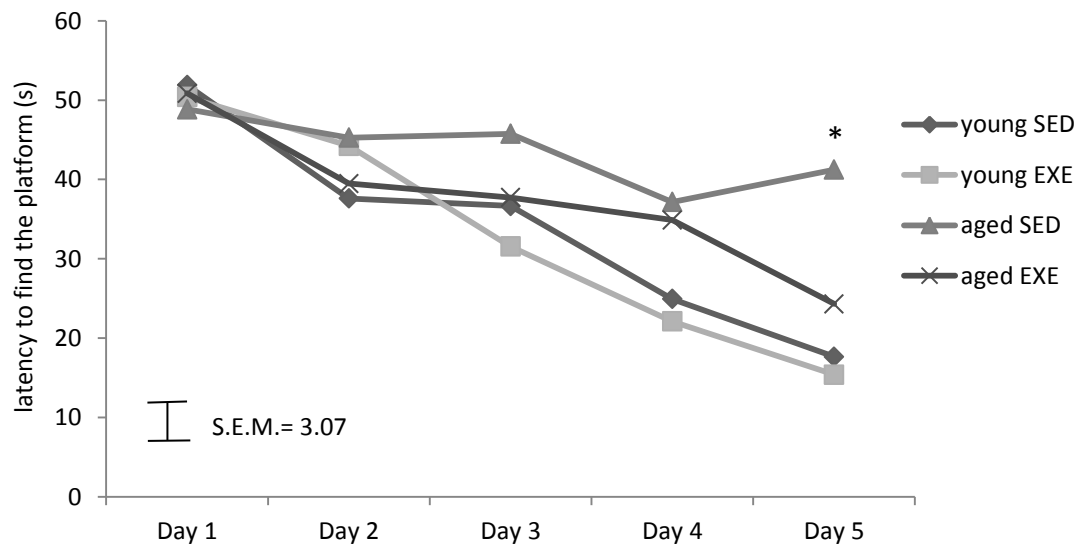


Figure 3A

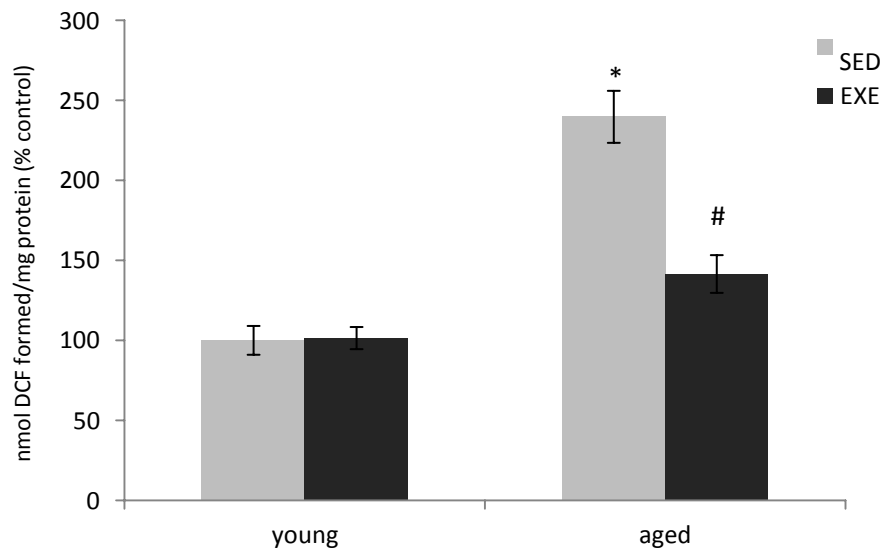


Figure 3B

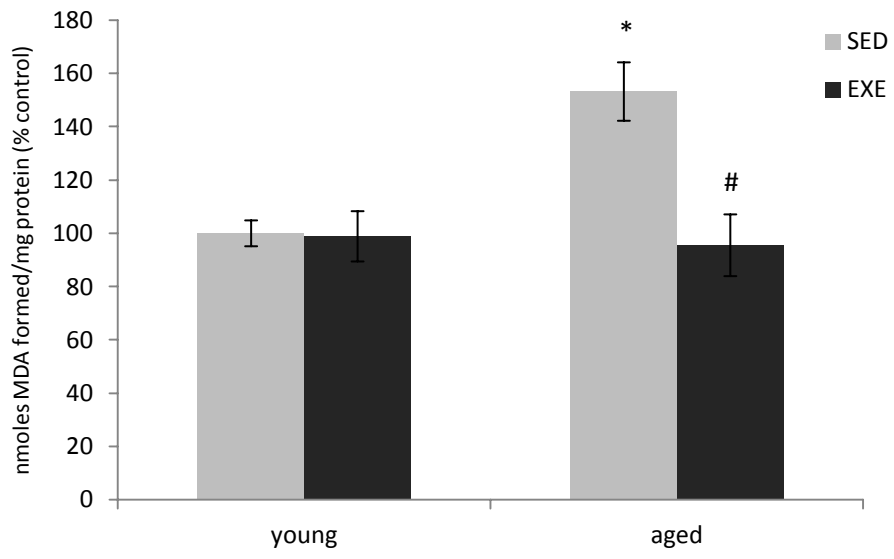




Figure 3C

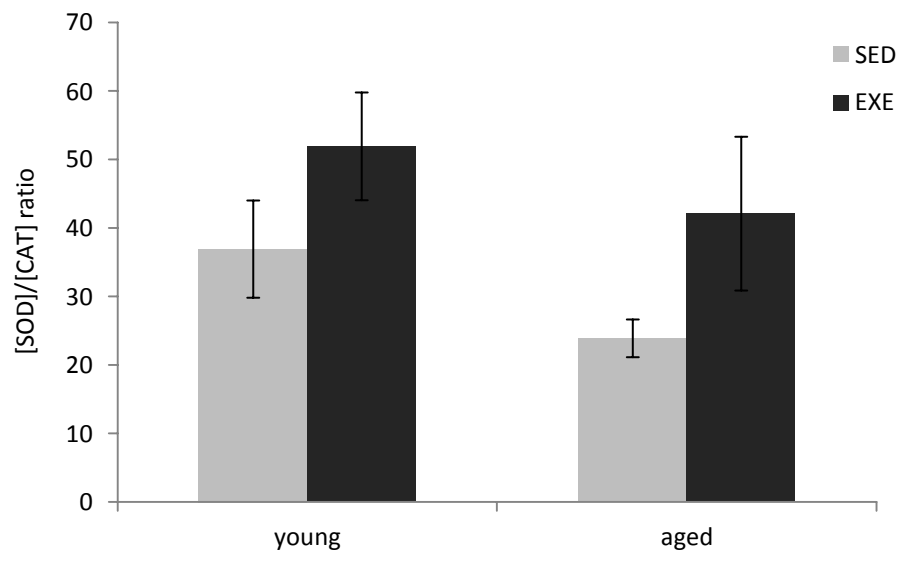


Figure 4A

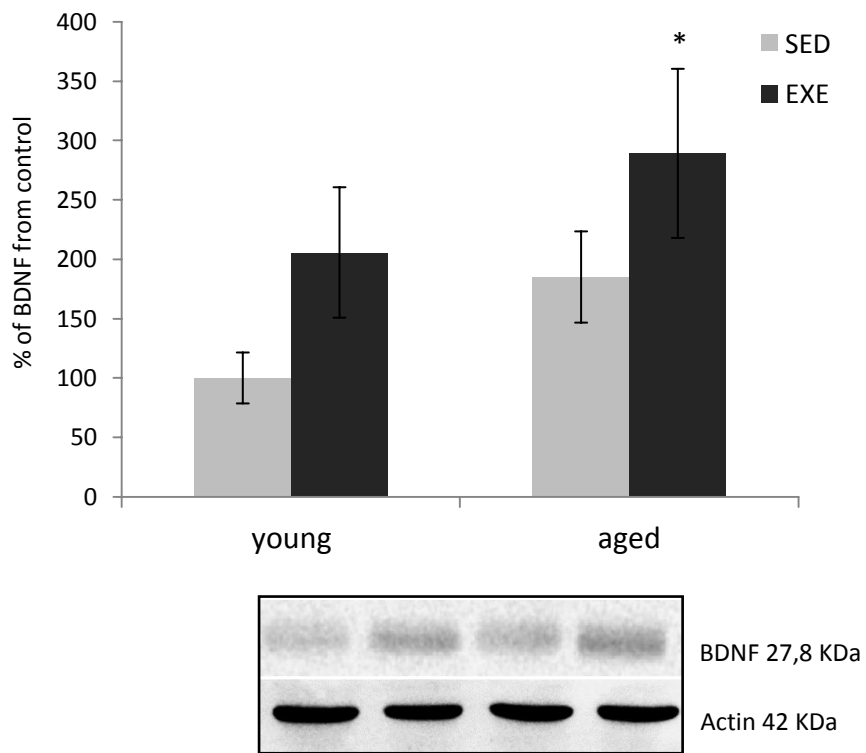


Figure 4B

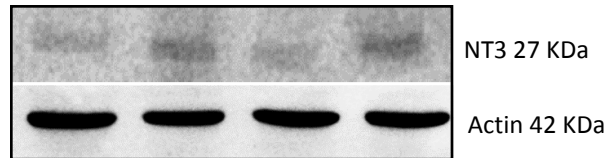
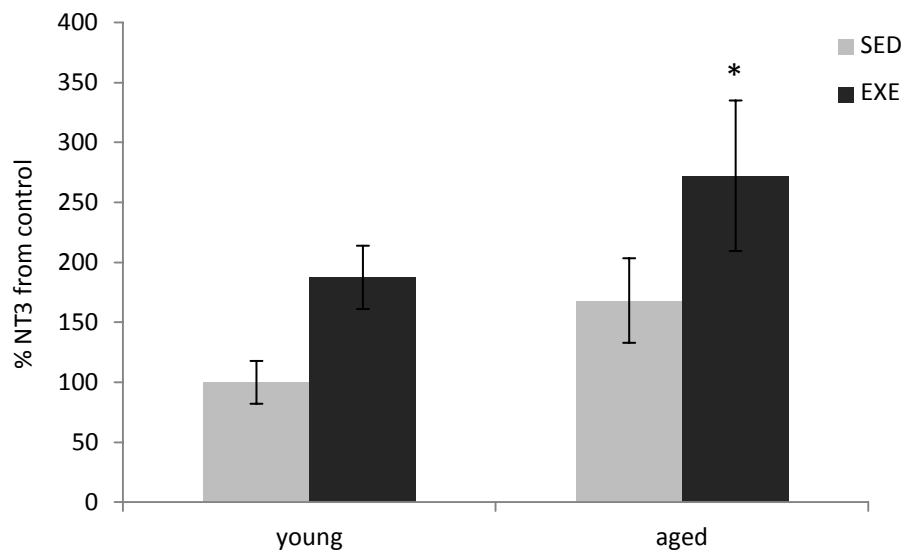


Figure 4C

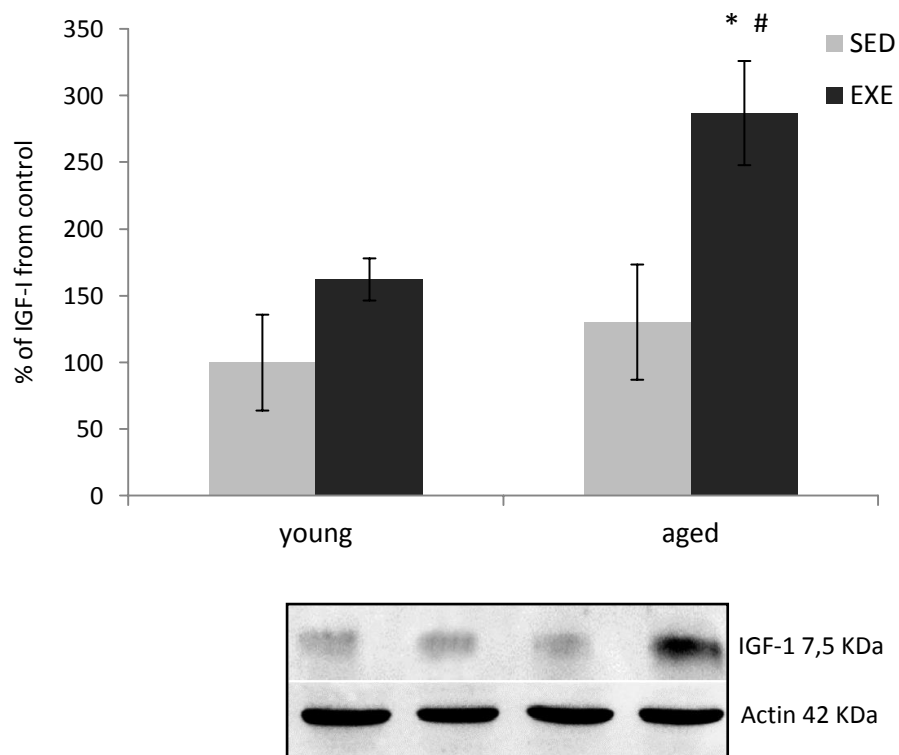
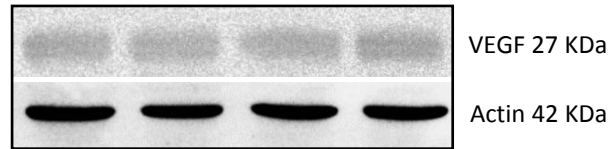
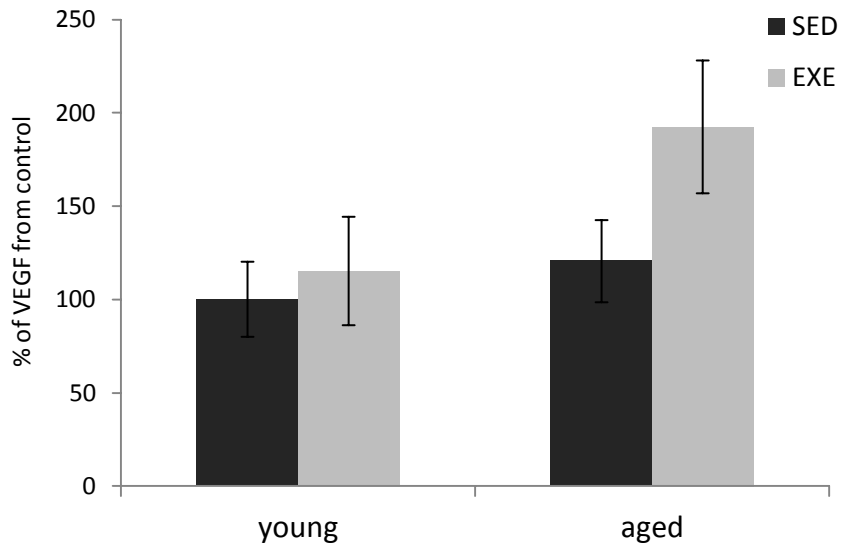


Figure 4D





Cláudia Vanzella &lt;cvanzella@gmail.com&gt;

---

**Submission BBR\_2016\_407 received by Behavioural Brain Research**

---

**Behavioural Brain Research** <EvisSupport@elsevier.com>  
Responder a: bbr@elsevier.com  
Para: cvanzella@gmail.com

8 de dezembro de 2016 13:39

*This message was sent automatically. Please do not reply.*

Ref: BBR\_2016\_407

Title: Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats

Journal: Behavioural Brain Research

Dear Mrs. Vanzella,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Behavioural Brain Research. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL\\_ACR=BBR](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=BBR) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Behavioural Brain Research

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.


-----  
Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

## 4. CAPÍTULO II

**Manuscrito:** Forced treadmill exercise prevents spatial memory deficits in aged rats probably through the activation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in the hippocampus – publicado no periódico *Neurochemical Research*

# Forced Treadmill Exercise Prevents Spatial Memory Deficits in Aged Rats Probably Through the Activation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the Hippocampus

Cláudia Vanzella<sup>1</sup>  Eduardo Farias Sanches<sup>1</sup> · Felipe Kawa Odorcyk<sup>2</sup> · Fabrício Nicola<sup>3</sup> · Janaina Kolling<sup>1</sup> · Aline Longoni<sup>1</sup> · Tiago Marcon dos Santos<sup>1</sup> · Angela Terezinha de Souza Wyse<sup>1</sup> · Carlos Alexandre Netto<sup>1</sup>

Received: 8 November 2016 / Revised: 24 January 2017 / Accepted: 28 January 2017  
© Springer Science+Business Media New York 2017

**Abstract** Regular physical activity has shown to improve the quality of life and to prevent age-related memory deficits. Memory processing requires proper regulation of several enzymes such as sodium–potassium adenosine triphosphatase (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase) and acetylcholinesterase (AChE), which have a pivotal role in neuronal transmission. The present study investigated the effects of a treadmill running protocol in young (3 months), mature (6 months) and aged (22 months) Wistar rats, on: (a) cognitive function, as assessed in the Water maze spatial tasks; (b) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and AChE activities in the hippocampus following cognitive training alone or treadmill running combined with cognitive training. Animals of all ages were assigned to naïve (with no behavioral or exercise training), sedentary (non-exercised, with cognitive training) and exercised (20 min of daily running sessions, 3 times per week for 4 weeks and with cognitive training) groups. Cognition was assessed by reference and working memory tasks run in the Morris Water maze; 24 h after last session of behavioral testing, hippocampi were collected for biochemical analysis. Results demonstrated that: (a) a moderate treadmill running exercise prevented spatial learning and

memory deficits in aged rats; (b) training in the Water maze increased both Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and AChE activities in the hippocampus of mature and aged rats; (c) aged exercised rats displayed an even further increase of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus, (d) enzyme activity correlated with memory performance in aged rats. It is suggested that exercise prevents spatial memory deficits in aged rats probably through the activation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the hippocampus.

**Keywords** Hippocampus · Aged rats · Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase · AChE · Cognitive training · Treadmill running

## Introduction

Aging is a complex biological process characterized by physiological and structural brain changes leading to different degrees of cognitive decline associated to neurodegenerative disorders [1]. According to the United Nations Department of Economic and Social Affairs (2013) [2] the proportion of the world's population aged 60 years or over increased from 8% in 1950, to 12% in 2013 and it is estimated to reach 21% in 2050, with a further increase in the frequency of age-related neurodegenerative diseases.

Cognitive impairment may be related to biochemical changes during aging [3]. The hippocampus is a pivotal structure for cognitive functions such as learning and memory, and seems to be particularly vulnerable to aging [4]. The appropriate function of the hippocampus depends on the activity of key membrane enzymes that also proved to be important for cognition. Sodium–potassium adenosine triphosphatase (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase), for instance, is a crucial transmembrane enzyme responsible for the electrochemical gradient across the cell membranes. It has

✉ Cláudia Vanzella  
cvanzella@gmail.com

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul 90035-003, Brazil

<sup>2</sup> Post-Graduation Program of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Post-Graduation Program of Neuroscience, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil



been demonstrated that Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase impairment is associated with spatial learning and memory deficits [5]; also the training on a spatial task is accompanied by an increase in activities of total ATPase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the hippocampus [6]. Interestingly, although some studies have demonstrated its role on memory processing [7, 8], there are just few reports on age-related changes of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity, with conflicting results [9, 10].

The cholinergic system seems to be specially impaired during aging [3]. A key enzyme in this system is acetylcholinesterase (AChE), which degrades acetylcholine (ACh) in the synaptic cleft, thus regulating neurotransmitter availability [11]. Interestingly, some studies have shown that hippocampal ACh release and vesicular ACh transporter expression are increased during cognitive training, such as performance of a learned spatial memory task [12, 13]; however, there are no reports on the AChE activity during cognitive training.

Several approaches have been investigated in order to reduce age-related symptoms, and physical exercise has proven to bear neuroprotective effects. Regular physical activity is an important non-pharmacological therapeutic/preventive strategy for many diseases, particularly to those related to brain aging [14, 15]. Accordingly, it has been shown that exercise improves performance in different learning and memory tasks in aged and young rodents [16–18]. In this context, forced treadmill running has been successfully used in several studies for its consistency, since all animals are submitted to the same experimental conditions [19], and showed to have a positive effects over the deficits related to aging [20, 21].

The present study investigates the effect of a moderate treadmill running exercise protocol in young, mature and aged Wistar rats, on: (a) cognitive function, as assessed in the Water maze spatial tasks; (b) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and AChE activities in the hippocampus after cognitive training alone or treadmill running combined with cognitive training. The working hypothesis is that exercise training will prevent age-related deficits in spatial reference and working memory, and that this effect might be associated to the studied enzyme activities.

## Materials and Methods

### Animals

Male Wistar rats of 3 (young), 6 (mature) and 22 (aged) months of age (total number of 129 animals, divided in four blocks of 30–35 animals each) were obtained from the Central Animal House of the Department of Biochemistry of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. Animals were maintained on

a 12/12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature (22 ± 1 °C) colony room, with free access to food and water. The NIH “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH publication No. 80 – 23, revised 1996) and the official governmental guidelines, in compliance with the Federação das Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental, were followed in all experiments. The aged animals were housed three per cage. The study was approved by the Ethics Committee of the University under protocol number 24199.

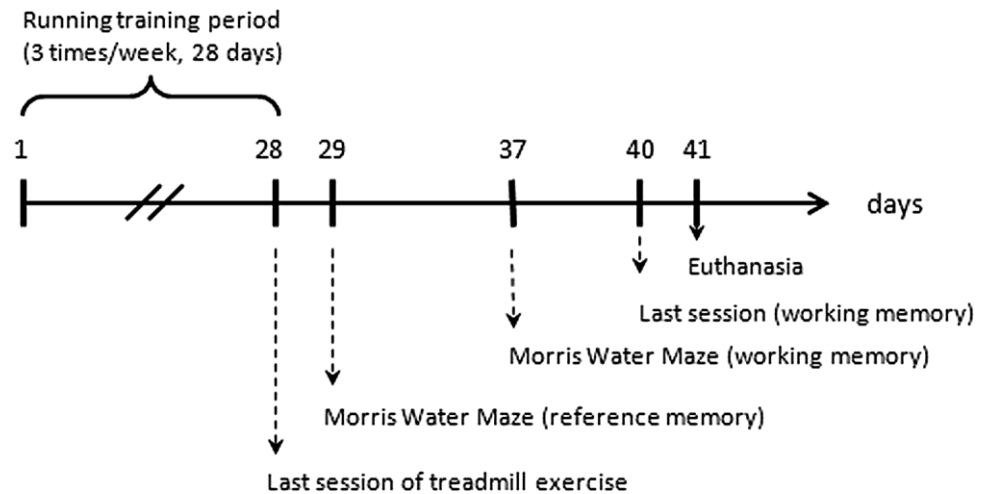
### Exercise Training

Rats were randomly divided into naïve (with no behavioral or exercise training), sedentary (SED) (non-exercised, with cognitive training) and exercised (EXE) (20 min daily running sessions, 3 times per week for 4 weeks and with cognitive training) groups. The exercise training consisted of running sessions in an adapted motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) at 60% of the animals’ maximal oxygen uptake [22]. Peak oxygen uptake (VO<sub>2</sub>) was measured indirectly in all animals before training, as follows. Each rat ran on the treadmill at a low initial speed with the speed being increased by 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 exercise capacity, which was in turn taken as VO<sub>2</sub> max [22, 23]. The exercise protocol was of daily 20 min running sessions, three times per week for 4 weeks [24, 25]. Any animal that refused to run was encouraged by gently tapping on the back. Sedentary rats were handled exactly as the experimental animals and were left on the treadmill for 5 min without any stimulus to run. All procedures occurred between 7 and 12 am. The experimental design is shown in Fig. 1.

### Spatial Memory in the Morris Water Maze

Twenty-four hours after the last exercise session rats were submitted to behavioral spatial memory testing in the Morris Water maze. The maze consisted of a black circular pool with 200 cm in diameter filled with water (temperature around 23 °C, depth 40 cm) situated in a room with visual cues on the walls. A transparent platform with 10 cm in diameter was submerged in the water (2 cm below the water surface) and the pool was conceptually divided into four quadrants and had four points designated as starting positions (N, S, W or E) [26, 27]. Two different spatial memory protocols were run: reference and working memory [28].

**Fig. 1** Diagram showing the timeline of experimental design. The treadmill exercise protocol (20 min/day, 3 times per week during 28 days) was used. Reference memory training started 24 h after the last session of treadmill exercise and was performed during 5 days, followed by the probe trial. The working memory protocol started 48 h after the probe trial and was performed during 4 days. Rats were euthanized 24 h after behavioral assessment and the hippocampus was dissected out for biochemical analysis



### Reference Memory Protocol

In this task rats received five daily training sessions and a probe trial in the 6th day. Each session consisted of four trials with 10 min of inter training session interval. A trial began when the rat was placed in the water at one of the four starting positions, chosen at random, facing the wall. The order of starting position varied in every trial and any given sequence was not repeated on acquisition phase days. The rat was given 60 s to locate the platform; if the animal did not succeed it was gently guided to the platform and left on it for 10 s. Rats were dried and returned to their home cages after each trial. The latency to find the platform was measured in each trial and the mean latency for every training day was calculated. The probe consisted of a single trial, as described before, with the platform removed. Here, the latency to reach the original platform position, the time spent in the target and in the opposite quadrants were analyzed [27–29].

### Working Memory Protocol

This protocol consisted of four trials/day, during four consecutive days, with the platform location daily changed. Each trial was conducted as described in the reference memory protocol, with a 5 min intertrial interval. Latency to find the platform was measured in each trial and the mean latency for every trial, along the 4 days, was calculated, allowing for the observation of the ability of animals in locating the novel platform position in the day [27, 29]. Working memory was assessed by the difference ( $\Delta$ ) between mean latencies of trial 1 (acquisition trial) and trial 4 (test trial) in the four sessions.

### Tissue Preparation

Twenty-four hours after last session of behavioral assessment, animals were euthanized by decapitation without anesthesia. The brain was rapidly removed and the hippocampus was quickly dissected out on a glass dish over ice.

### Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Activity Assay

The hippocampi were homogenized in ten volumes (1:10, w/v) of 0.32 mM sucrose solution containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA, pH 7.5. The homogenates were centrifuged at 1000×g for 10 min; the supernatants were removed for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity determination.

The reaction mixture for Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity assay contained 5.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl and 40.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, in final volume of 200 μL. The reaction was initiated by addition of ATP to a final concentration of 3.0 mM. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays, as described by [30]. Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of [31]. Specific activity of the enzyme was expressed as nmol Pi released per min per mg of protein. All samples were run in duplicates.

### AChE Activity Assay

For the AChE assay the hippocampi were homogenized in ten volumes of 0.1 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, and centrifuged for 10 min at 1000×g. The supernatants were used for the enzymatic AChE analyses. AChE

activity was determined according to the method of Ellman and colleagues [32]. Hydrolysis rates were measured at ACh concentration of 0.8 mM in 300  $\mu$ L assay solution with 30 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) at 25 °C. About 15  $\mu$ L of hippocampus supernatant was added to the reaction mixture and preincubated for 3 min. The hydrolysis was monitored by formation of the thiolate dianion of DTNB at 412 nm for 2–3 min (intervals of 30 s). All samples were run in triplicate.

### Protein Determination

Protein was measured by the method of Lowry and colleagues (1951) [33] using bovine serum albumin as standard.

### Statistical Analysis

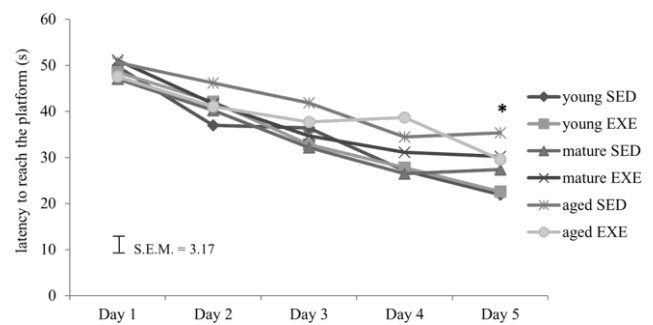
Latencies in the reference memory training were analyzed using two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA), with aging and exercise as independent variables and session as the repeated measure. Latencies in the working memory task, as well as results of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and AChE were analyzed by two-way ANOVA or one-way ANOVA, whenever appropriate, followed by Duncan's post hoc test. Values are expressed as mean  $\pm$  standard error (S.E.). Pearson correlation analysis was used to study the relationship between behavioral and biochemical results. Significance was assumed whenever  $p < 0.05$ .

## Results

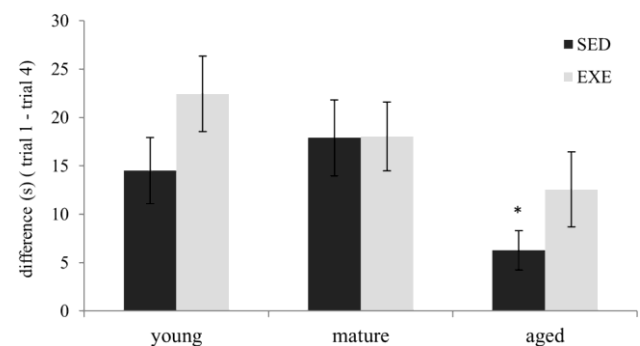
### Reference Memory

Sedentary aged rats showed reference memory acquisition deficit, as expected, requiring more time to reach the platform in the 5th day of training ( $35.35 \pm 2.82$  s) than the SED young rats ( $21.9 \pm 1.84$  s), [Fig. 2;  $F_{(2, 99)} = 5.79$ ;  $p < 0.05$ ]. Interestingly, the latency of the EXE aged group to reach the platform ( $29.6 \pm 3.6$  s) was not significantly different from that of the SED young group, i.e., the exercise was able to prevent the age-related memory deficit. Both mature groups, SED and EXE, did not show performance differences when compared to the young ones ( $27.38 \pm 4.10$ ;  $30.20 \pm 3.46$ ; respectively). Surprisingly, both aged groups (SED =  $40.26 \pm 4.37$ , and EXE =  $37.06 \pm 4.96$ ) differed from the SED young group (control,  $23.09 \pm 1.99$ ) in the time to reach the platform area during the probe trial [ $F_{(2, 105)} = 5.625$ ;  $p < 0.05$ ].

Aging did not cause any gross motor deficit, since the mean of swimming speed was  $0.7 \pm 0.002$  cm/s for control



**Fig. 2** Effect of aging and treadmill running on the latency to find the platform during the five training sessions in the Water maze reference memory protocol ( $n = 12$ –29 animals per group). Data are expressed as means and were analyzed by repeated measures ANOVA followed by Duncan's post hoc test. The standard error mean, SEM bar, shows the mean of standard errors for all groups/days. Values were considered significant when  $p < 0.05$ . \*significantly different from the control group (young SED rats)



**Fig. 3** Effect of aging and treadmill running on the Water maze working memory performance ( $n = 12$ –19 animals per group). Bars represent mean  $\pm$  SE of latencies differences between 1st and 4th trial. Results were analyzed by two-way ANOVA followed by Duncan's post hoc test. Values were considered significant when  $p < 0.05$ . \*significantly different from the control group (young SED rats)

animals (SED young rats) and  $0.5 \pm 0.002$  cm/s for SED aged rats [ $F_{(2, 61)} = 0.152$ ;  $p > 0.05$ ]. The general mean of swim speed was  $0.5 \pm 0.002$  cm/s for all animals.

### Working Memory

Working memory was assessed by the difference (delta) between mean latencies of trial 1 (acquisition trial) and trial 4 (test trial) in the four sessions. Similarly, the SED aged group showed a clear working memory impairment ( $6.28 \pm 2.03$  s) in comparison with the SED young group ( $14.5 \pm 3.42$  s) [Fig. 3;  $F_{(2, 87)} = 4.09$ ;  $p < 0.05$ ]. The exercised aged group performance did not differ from that of young controls; i.e., the running exercise also prevented the age-related working memory deficit. Both mature groups

had performances similar to those of young SED and EXE groups.

**Biochemical Analysis**

The assessment of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus of naïve rats revealed no activity differences during aging (Table 1). On the other hand, as shown in Fig. 4, the Water maze training alone was able to increase the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in both SED mature and aged groups. Moreover, treadmill running combined with cognitive training further increased in enzyme activity when compared to all other groups [F<sub>(4, 54)</sub> = 6.35; *p* < 0.05], suggesting that this enzyme is altered by both cognitive training and exercise. Interestingly, there was a positive correlation between Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the EXE aged group and the time to reach the platform in the 5th day of training in the reference memory task (Fig. 5a, *r* = 0.68; *p* < 0.01), i.e., the increase in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity is associated with the exercise-related memory improvement in aged rats. Consistently, a negative correlation between Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and the difference (delta) between mean latencies of trial 1 and trial 4 in the working memory task (Fig. 5b, *r* = -0.67; *p* = 0.01) was also found, i.e., the EXE aged rats showed better performance in the working memory task associated with the increase in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity.

The results of AChE activity in the hippocampus of naïve rats demonstrated a decrease of enzyme activity in aged rats, as compared with young ones (Table 1). Conversely, the cognitive training increased the AChE activity in all age groups when compared to the naïve young group [Fig. 6; F<sub>(4, 47)</sub> = 19.38; *p* < 0.05], whereas treadmill running did not potentiate the observed effect. This suggests that AChE enzymatic activity is modified by cognitive training, but not by treadmill exercise.

**Discussion**

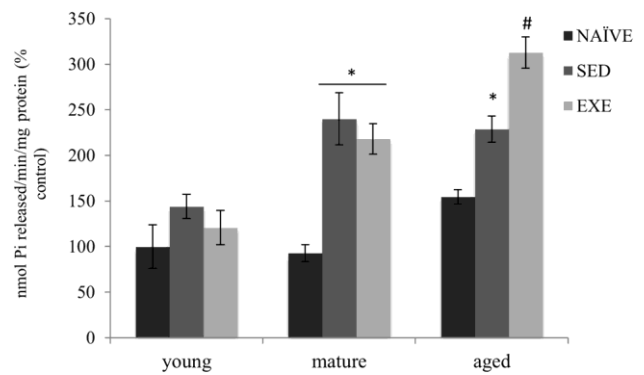
Consistent with our hypothesis, present results show that a moderate treadmill running protocol prevents age-induced

**Table 1** Effect of aging on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and AChE activities in the hippocampus of naïve rats

Groups	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase (nmol Pi released/min/mg protein—% control)	AChE (μmol ACSh/h/mg protein—% control)
Young	31.94 ± 7.65	1.24 ± 0.068
Mature	29.58 ± 4.26	1.30 ± 0.040
Aged	49.36 ± 5.98	1.04 ± 0.063*

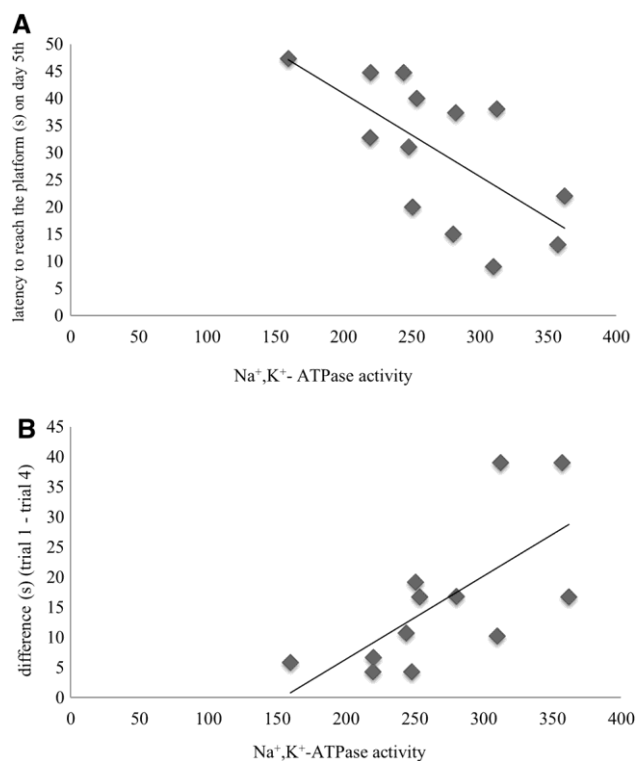
Values are expressed as mean ± standard error

\*Significantly different from control group (young rats)

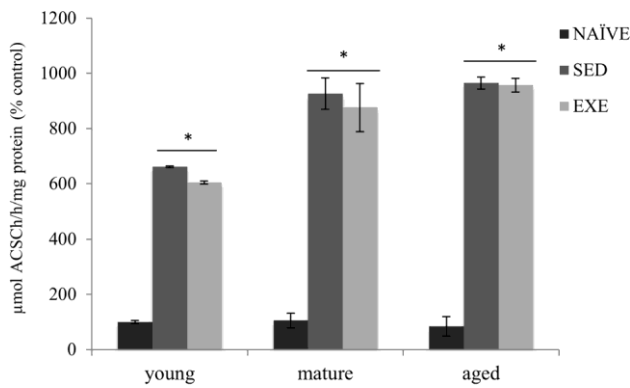


**Fig. 4** Effect of aging, cognitive training and treadmill running combined with cognitive training on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus of rats (*n* = 4–8 animals per group). Results are expressed as percentage of naïve group (mean ± SE) and analyzed by Two-way ANOVA followed by Duncan’s post hoc test. \*significantly different from control group (naïve group); #significantly different from all others groups; \**p* < 0.05

spatial reference and working memory deficits in aged rats. The Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity was altered both by cognitive training and treadmill running, however, the AChE



**Fig. 5** Correlation findings in aged rats: **A** correlation between Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and reference memory (time to find the platform in the 5th day of training) (*r* = 0.68; *p* < 0.01) and **B** correlation between Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and working memory (difference between mean latencies of trial 1 and trial 4) (*r* = -0.67; *p* = 0.01). Data analyzed by Pearson’s test



**Fig. 6** Effect of aging, cognitive training and treadmill running combined with cognitive training on AChE activity in the hippocampus of rats ( $n = 4-8$  animals per group). Results are expressed as percentage of naïve group (mean  $\pm$  SE) and analyzed by Two-way ANOVA followed by Duncan's post hoc test. \*significantly different from control group (naïve group)

enzymatic activity was affected only by the cognitive training. Since there were powerful correlations between memory performance and the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in the exercised aged rats, we suggest that the increase in this enzyme is an important component of the mechanism through which exercise prevents age-related cognitive deficits. To our knowledge, this is the first study that investigates the effect of both cognitive training and treadmill exercise on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and AChE activities during aging.

Presented findings confirm previous reports showing that memory impairment is associated with aging [34, 35]. Rat cognition was here assessed by using Morris Water maze tasks, a hippocampus-dependent spatial learning test in which animals are required to learn the location of a hidden platform in the pool, and that incorporates both reference and working memory [28, 35]. Present data demonstrates that aged rats showed deficit on acquisition of reference memory task and memory deficit in the working memory task when compared to young animals. As predicted, moderate treadmill running exercise was able to prevent both aged-related cognitive deficits, improving the performance of aged rats in both Water maze tasks. However, in the probe trial both aged groups differed from control rats (SED young group) in the time to find the platform area, which demonstrates that the exercise protocol here used improved memory acquisition, but did not affect memory retention. Previous report shows that treadmill exercise during 2 weeks improves the aversive memory [20], as well as voluntary wheel running enhances spatial memory task in aged rats [36].

In order to understand the mechanism by which physical exercise improves memory performance, its effects on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and AChE activities in the hippocampus of

male aged rats were investigated. As previously mentioned,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase is a crucial membrane protein responsible for the active transport of sodium and potassium ions in the nervous system, necessary to maintain the ionic gradient for neuronal excitability [8]. In addition, among the various functions already described, some studies have shown the influence of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase enzyme on memory processing [7, 8]. However, until now, few studies evaluated the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity during brain aging [9, 37]. Present results showed no differences in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in the hippocampus during aging (Table 1). However, cognitive training in Morris Water maze increased the activity of this enzyme in the hippocampus of mature and aged rats. In agreement with our finding, Tsakiris and colleagues [38] demonstrated that  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity was significantly increased in the brain of adult male rats submitted to a forced swimming. Besides, Moseley and colleagues [5] reported that  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase alpha-2 and -3 isoforms-deficient mice displayed learning and memory deficits. It was also reported that spatial memory training is accompanied by increase in monomeric and dimeric forms of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase subunit alpha-3, which is exclusively expressed in neurons and highly expressed in hippocampus, as well as an increase in activity of this enzyme [6]. Results in Fig. 4 showed that treadmill running combined with cognitive training was able to further increase the  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in the hippocampus of aged male rats and this effect probably contributed to the improvement of memory in these animals. Accordingly, there was a positive correlation between the increased in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity and the performance of exercised aged rats in the 5th day of training in the reference memory task, as well as in the working memory task, where exercised aged rats also presented improved memory performance, thus demonstrating that the exercise-related memory improvement might be associated with the increase in the activity of this enzyme.

Additionally, it is well known that the cholinergic system of mammalian brain plays an important role during learning and memory and seem to be specially impaired during aging [3, 39]. In this context, AChE has been extensively studied in last years as a therapeutic target, particularly for the symptomatic treatment of neurodegenerative diseases [3]. Accordingly, we observed a decrease in AChE activity in the hippocampus of aged rats when compared to young ones (Table 1). This finding is in agreement with data from literature, demonstrating that AChE activity is decreased in the brain with aging [3, 10]. Indeed, Carageorgiou and colleagues [10] reported that 24 months-old rats showed a reduction in AChE activity in the whole brain in comparison to the 8 months-old rats. Nevertheless, cognitive training alone was able to increase the AChE activity in the hippocampus of young, mature and aged rats, it is possible that

the increase in AChE activity is due to the increase in ACh release, a result of cognitive training [12, 13]. In addition, the cognitive training might have improved AChE function, since it was demonstrated that the learning of a spatial task modifies the function of cholinergic neurons projecting to the hippocampus, which become progressively more active [40]. Besides, it has also been shown that spatial learning increases muscarinic ACh receptor immunoreactivity in cell bodies of CA1–CA2 pyramidal neurons [41]. On the other hand, it was observed that treadmill running combined with cognitive training was not able to further increase AChE activity.

Concluding, our results demonstrated that: (a) a moderate treadmill running exercise prevented age-related deficits in spatial learning and memory deficits in aged rats; (b) training in the Water maze increased both Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and AChE activities in the hippocampus of mature and aged rats; (c) aged exercised rats displayed an even further increase of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in the hippocampus; (d) enzyme activity correlated with memory performance in aged rats. It is suggested that exercise prevents spatial memory deficits in aged rats probably through the activation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the hippocampus. Further studies are needed to describe the mechanisms through which Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activation mediates memory function during aging.

**Acknowledgements** This research was partially supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## References

- Migliore L, Coppedè F (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 674:73–84. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.013
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs PD (2013) World population ageing, United Nations 114 ST/ESA/SER.A/348
- Haider S, Saleem S, Perveen T, et al (2014) Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age (Omaha)* 36:1291–1302. doi:10.1007/s11357-014-9653-0
- Serrano F, Klann E (2004) Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Res Rev* 3:431–443. doi:10.1016/j.arr.2004.05.002
- Moseley AE, Williams MT, Schaefer TL et al (2007) Deficiency in Na, K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci* 27:616–626. doi:10.1523/JNEUROSCI.4464-06.2007
- Heo S, Csaszar E, Jung G et al (2012) Hippocampal levels and activity of the sodium/potassium transporting ATPase subunit alpha-3 (AT1A3) are paralleling memory training in the multiple T-Maze in the C57BL/6 J mouse. *Neurochem Int* 61:702–712. doi:10.1016/j.neuint.2012.07.006
- dos Reis-Lunardelli E, Castro C, Bavaresco C et al (2007) Effects of thyroid hormones on memory and on Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat brain. *Curr Neurovasc Res* 4:184–193
- Wyse ATS, Bavaresco CS, Reis EA et al (2004) Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus. *Physiol Behav* 80:475–479. doi:10.1016/j.physbeh.2003.10.002
- Fraser CL, Arief AI, Cosmo L (2001) Na-K-ATPase activity decreases with aging in female rat brain synaptosomes. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:674–678
- Carageorgiou H, Sideris AC, Messari I et al (2008) The effects of rivastigmine plus selegiline on brain acetylcholinesterase, (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-, Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities, antioxidant status, and learning performance of aged rats. *Neuropsychiatr Dis Treat* 4:687–699
- Soreq H, Seidman S (2001) Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2:294–302. doi:10.1038/35067589
- Ragozzino ME, Unick KE, Goldt PE, Mcgaugh JL (1996) Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. *Psychology* 93:4693–4698
- Stancampiano R, Cocco S, Cugusi C et al (1999) Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Neuroscience* 89:1135–1143. doi:10.1016/S0306-4522(98)00397-2
- Radak Z, Koltai E, Taylor AW et al (2013) Redox-regulating sirtuins in aging, caloric restriction, and exercise. *Free Radical Biol Med* 58:87–97. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.004
- Radák Z, Kaneko T, Tahara S et al (2001) Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int* 38:17–23. doi:10.1016/S0197-0186(00)00063-2
- Berchtold NC, Chinn G, Chou M et al (2005) Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience* 133:853–861. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.03.026
- Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I (2008) Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cienc* 80:301–309. doi:10.1590/S0001-37652008000200008
- Kumar A, Rani A, Tchigranova O et al (2012) Influence of late-life exposure to environmental enrichment or exercise on hippocampal function and CA1 senescent physiology. *Neurobiol Aging* 33(828):e1–e828.e17. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.06.023
- Moraska A, Deak T, Spencer RL et al (2000) Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1321–R1329
- Lovatel GA, Elsner VR, Bertoldi K et al (2013) Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, Neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 101:94–102. doi:10.1016/j.nlm.2013.01.007
- Cechinel LR, Basso CG, Bertoldi K, Schallenger B, de Meireless LC, Siqueira IR (2016) Treadmill exercise induces age and protocol-dependent epigenetic changes in prefrontal cortex of Wistar rats. *Behav Brain Res* 313:82–87
- Brooks GA, White TP (1978) Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol* 45:1009–1015
- Arida RM, Scorza FA, dos Santos NF et al (1999) Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res* 37:45–52

24. Ben J, Soares FMS, Cechetti F et al (2009) Exercise effects on activities of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats. *Brain Res* 1302:248–255. doi:[10.1016/j.brainres.2009.09.013](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.013)
25. Cechetti F, Worm PV, Elsner VR et al (2012) Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 97:90–96. doi:[10.1016/j.nlm.2011.09.008](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.09.008)
26. Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47–60
27. Pereira LO, Arteni NS, Petersen RC et al (2007) Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 87:101–108. doi:[10.1016/j.nlm.2006.07.003](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.07.003)
28. Netto CA, Hodges H, Sinden JD et al (1993) Effects of fetal hippocampal field grafts on ischaemic-induced deficits in spatial navigation in the water maze. *Neuroscience* 54:69–92. doi:[10.1016/0306-4522\(93\)90384-R](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90384-R)
29. Cechetti F, Worm PV, Pereira LO et al (2010) The modified 2VO ischemia protocol causes cognitive impairment similar to that induced by the standard method, but with a better survival rate. *Brazilian J Med Biol Res* 43:1178–1183. doi:[10.1590/S0100-879X2010007500124](https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500124)
30. Wyse ATS, Streck EL, Barros SV et al (2000) Methylmalonate administration decreases Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11:2331–2334
31. Chan L, Swaminathan R (1986) Adenosine triphosphate interferes with phosphate determination. *Clin Chem* 32:1961
32. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95
33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
34. Succi DJ, Sanberg PR, Arendash GW (1995) Nicotine enhances morris water maze performance of young and aged rats. *Neurobiol Aging* 16:857–860
35. Taridi NM, Rani NA, Latiff AA et al (2014) Tocotrienol rich fraction reverses age-related deficits in spatial learning and memory in aged rats. *Lipids* 49:855–869. doi:[10.1007/s11745-014-3919-2](https://doi.org/10.1007/s11745-014-3919-2)
36. Van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 25:8680–8685
37. Koçak H, Öner P, Özta B (2002) Comparison of the activities of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in brains of rats at different ages. *Exp Sect Gerontol* 48:279–281
38. Tsakiris T, Angelogianni P, Tesseromatis C et al (2008) Effect of L-carnitine administration on the modulated rat brain protein concentration, acetylcholinesterase, Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase and Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities induced by forced swimming. *Br J Sports Med* 42:367–372. doi:[10.1136/bjism.2007.039792](https://doi.org/10.1136/bjism.2007.039792)
39. Hosseini-Sharifabad A, Mohammadi-Eraghi S, Tabrizian K et al (2011) Effects of training in the Morris water maze on the spatial learning acquisition and VAcHT expression in male rats. *Daru* 19:166–172
40. Fadda F, Cocco S, Stancampiano R (2000) Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats. *Neuroreport* 11:2265–2269. doi:[10.1097/00001756-200007140-00040](https://doi.org/10.1097/00001756-200007140-00040)
41. Van der Zee EA, Compaan JC, Bohus B, Luiten PGM (1995) Alterations in the immunoreactivity for muscarinic acetylcholine receptors and colocalized PKC $\gamma$  in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning. *Hippocampus* 5:349–362. doi:[10.1002/hipo.450050408](https://doi.org/10.1002/hipo.450050408)

## **5. CAPÍTULO III**

Efeito do exercício físico sobre o estado oxidativo celular no músculo esquelético (sóleo) de ratos Wistar machos de 3 e 22 meses de idade.



## 1. INTRODUÇÃO

A sarcopenia é um fenômeno natural do processo de envelhecimento que resulta em perda de massa, de força e de função do músculo esquelético, normalmente acompanhada pela diminuição da mobilidade, da resistência física e de lentidão da marcha, fatores que aumentam o risco de quedas e de fraturas entre os idosos (Mitchell *et al.*, 2012).

O músculo esquelético humano é composto por dois tipos principais de fibras, do tipo I e II (Brooke e Kaiser, 1970). Existe uma variação na proporção destas fibras entre os músculos das diferentes regiões do corpo, o que está relacionado com a função desempenhada por cada um deles (Barstow *et al.*, 1996). As fibras do tipo I são fibras de contração lenta, apresentam um menor diâmetro e são ricas em mitocôndrias e enzimas oxidativas, enquanto que, as fibras do tipo II são de contração rápida, apresentam diâmetro maior e têm predomínio do metabolismo energético anaeróbico (Powers *et al.*, 1994).

Embora as causas da perda da função e da massa muscular relacionada à idade ainda não sejam totalmente compreendidas, o declínio funcional do músculo esquelético parece estar fortemente associado ao estresse oxidativo (Szczesny *et al.*, 2010). Além disso, estudo realizado por Porter (1995) demonstrou que com o avançar da idade o músculo esquelético de seres humanos diminui gradualmente de volume, principalmente devido a uma redução do número de unidades motoras e de fibras musculares, além da redução no tamanho das fibras do tipo II. Outro estudo demonstrou que, além da redução no tamanho das fibras do tipo II, o envelhecimento também promove uma troca de fibras do tipo II para fibras do tipo I (Balagopal *et al.*, 2001). Assim, os músculos que apresentam alta porcentagem de fibras de tipo I

são menos afetados e não apresentam grandes alterações pelo envelhecimento.

Entre as alterações do estado oxidativo celular que ocorrem no músculo com o envelhecimento, alguns estudos em roedores destacam um aumento do conteúdo de espécies reativas no músculo vasto lateral profundo (Bejma e Ji, 1999) e também um aumento da lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos envelhecidos (Lambertucci *et al.*, 2007).

No organismo, os tecidos com maior taxa de consumo de oxigênio, como o cérebro, por exemplo, expressam maiores quantidades de enzimas antioxidantes do que aqueles com menor atividade metabólica (Jenkins, 1993). No músculo, um órgão bastante heterogêneo, a atividade das enzimas antioxidantes varia muito de acordo com o tipo de fibras; assim, as fibras do tipo I, por apresentarem caráter oxidativo, possuem maior atividade das enzimas antioxidantes em comparação às fibras do tipo II (Schiaffino e Reggiani, 2011).

Adams e colaboradores (1994) demonstraram que o músculo sóleo de ratos apresenta cerca de 97% de fibras do tipo I e apenas 3% de fibras do tipo II. Assim, por apresentar uma composição homogênea de fibras e ser um músculo que tem função postural, o sóleo é considerado um bom modelo para a investigação das alterações fisiológicas induzidas pelo treinamento físico em ratos jovens e envelhecidos (Lambertucci *et al.*, 2007).

Estudos em roedores demonstraram que a atividade contrátil do músculo pode promover o aumento acentuado de espécies reativas, devido ao aumento do consumo de O<sub>2</sub>, especialmente nos casos de exercício intenso ou agudo (Davies *et al.*, 1982; Bejma and Ji, 1999). Durante o treinamento, a produção de espécies reativas tem sido atribuída ao alto consumo de O<sub>2</sub>, que pode

chegar a 10-20 vezes os níveis sistêmicos (Astrand *et al.*, 1986) e até 100 a 200 vezes os níveis do músculo esquelético (Halliwell and Gutteridge, 2007), resultando em aumento substancial do fluxo de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial.

Contudo, o aumento de espécies reativas no músculo durante a atividade física parece ser necessário para promover a regulação das defesas antioxidantes endógenas, conforme postulado pela teoria da Hormese (Pingitore *et al.*, 2015). Neste contexto, alguns estudos têm demonstrado que, embora exista uma adaptação das defesas antioxidantes no organismo em resposta ao aumento da geração de substâncias oxidantes, essa adaptação é afetada no músculo de animais envelhecidos, de maneira que a produção de espécies reativas é superior à capacidade do sistema de defesa antioxidante, o que pode resultar em dano oxidativo ao músculo (Ji, 1993; Dilger e Johnson, 2008).

Assim, considerando que os efeitos do exercício físico ocorrem no organismo como um todo e que o músculo de ratos senescentes pode apresentar alterações decorrentes do envelhecimento, o objetivo desse capítulo foi avaliar o efeito do exercício físico moderado sobre o estado oxidativo celular no músculo sóleo dos ratos senescentes. A nossa hipótese de trabalho é de que o músculo sóleo dos ratos senescentes apresenta uma resposta diferente frente às alterações do estado oxidativo como consequência do treinamento físico quando comparado ao músculo dos ratos jovens.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

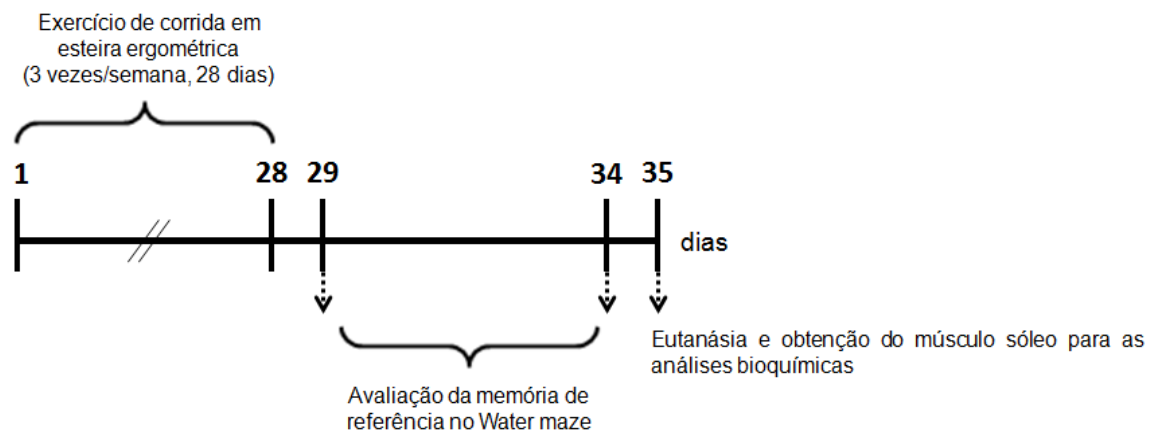
### **2.1 Animais**

Ratos Wistar machos de 3 (jovens) e 22 meses de idade (envelhecidos) foram obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. Eles foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C), com ciclo claro/escuro (12/12 h), água e comida disponíveis *ad libitum*. Em todos os experimentos, foram seguidos o "Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório" do NIH (publicação NIH No. 80-23, revisada em 1996) e as diretrizes governamentais oficiais, em conformidade com a Federação das Sociedades Brasileiras de Biologia Experimental. Os animais envelhecidos foram alojados em número de três por gaiola. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade sob o protocolo número 24199.

### **2.2 Protocolo de exercício físico**

Os animais foram habituados na esteira ergométrica com o objetivo de minimizar estresse à novidade e foram divididos aleatoriamente em grupos sedentários (SED, não exercitados) e exercitados (EXE, 20 min de sessões diárias de corrida, 3 vezes por semana durante 4 semanas). O treinamento físico consistiu em sessões de corrida em uma esteira motorizada adaptada para roedores (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brasil) a 60% da capacidade máxima de oxigênio dos animais (Cechetti *et al.*, 2012). O pico máximo de oxigênio ( $VO_2$ ) foi mensurado indiretamente em todos os animais antes do treino. Cada rato correu a uma baixa velocidade inicial; a velocidade foi aumentada em 5 m/min a cada 3 min até ao ponto de exaustão (isto é, falha dos ratos de continuar a correr). O tempo de fadiga (em min) e a carga de

trabalho (em m/min) foram tomados como índices de capacidade de exercício, que foi por sua vez tomado como  $VO_2$  máximo. Todos os procedimentos foram realizados entre 7 e 12 horas. O desenho experimental está demonstrado na Figura 1.



**Figura 1.** Desenho experimental. O protocolo de exercício de corrida em esteira ergométrica (20 min/dia, 3 vezes por semana durante 28 dias) foi utilizado. Avaliação da memória de referência iniciou-se 24 horas após a última sessão de exercício e foi realizado durante 5 dias, seguido pelo *probe trial*. Os ratos foram sacrificados 24 horas após a avaliação comportamental e o músculo sóleo foi dissecado para análise bioquímica.

### 2.3 Labirinto aquático de Morris

Após 24 horas da última sessão de exercício físico a memória espacial dos animais foi avaliada utilizando-se o labirinto aquático de Morris. O labirinto consiste em um tanque circular de 200 cm de diâmetro, sendo 40 cm de profundidade cobertos por água (temperatura de  $\pm 23^\circ\text{C}$ ), situado em uma sala contendo pistas visuais nas paredes que o cercam. Uma plataforma com 10 cm de diâmetro encontra-se submersa 2 cm abaixo da superfície da água. Esta piscina é dividida, virtualmente, em 4 quadrantes e possui 4 pontos de largada para o teste, designados como N (norte), S (sul), L (leste) e O (oeste). Para a avaliação da memória, foram utilizados 2 protocolos distintos, descritos abaixo:

### **2.3.1 Protocolo de memória de referência**

Neste protocolo a posição da plataforma permaneceu no mesmo local durante todo o período de treino.

Os ratos foram submetidos a uma sessão diária de treinamento durante 5 dias e o teste foi realizado no 6º dia. Cada sessão consistiu de quatro “*trials*” com 10 minutos de intervalo entre eles. Nos *trials*, as posições de partida foram escolhidas aleatoriamente e cada animal foi colocado no tanque sempre de frente para a parede. A ordem da posição de partida variou em cada *trial* e nenhuma sequência foi repetida nos dias de fase de aquisição. Os ratos tinham 60 segundos para localizar a plataforma em cada *trial*; se a plataforma não fosse encontrada, o animal era gentilmente guiado e deixado sobre ela por cerca de 10 segundos. Após cada *trial* os animais eram secos e colocados em suas gaiolas. A latência para encontrar a plataforma foi medida em cada *trial* e a latência média para cada dia de treinamento foi calculada. Vinte e quatro horas após o último treino, um teste de 60 segundos (*probe trial*), sem a plataforma foi realizado para avaliar a memória de longo prazo para a posição da plataforma. Todos os animais foram colocados no labirinto em um mesmo ponto, o mais longe possível da posição da plataforma e foi avaliado o tempo que cada animal levou para encontrar a posição inicial da plataforma (Arteni *et al.*, 2003). Os resultados deste teste cognitivo foram relatados no Capítulo I e por isso não serão repetidos neste Capítulo.

### **2.4 Preparação das amostras**

Vinte e quatro horas após a última sessão de avaliação comportamental, os animais foram eutanasiados por decapitação, sem anestesia e o músculo sóleo bilateral foi removido cirurgicamente. Para avaliar o conteúdo das

espécies reativas, das sulfidrilas, das proteínas carboniladas e as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), o sóleo foi homogeneizado em 10 volumes (1:10, p/v) de tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4 contendo KCl 140 mM. Os homogeneizados foram então centrifugados a 800 x g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios. Para determinar os níveis de TBARS, o sóleo foi homogeneizado num tubo de Pyrex 1:10 (p/v) em KCl a 1,15%. Os homogeneizados foram centrifugados a 800 x g durante 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio.

## **2.5 Determinação de espécies reativas**

A produção de espécies reativas foi avaliada de conforme descrito por LeBel e colaboradores (1992) e baseou-se na oxidação de 2'7'-dicloro-diidrofluoresceína ( $H_2DCF$ ). As amostras (60  $\mu$ L) foram incubadas no escuro durante 30 minutos (37 °C) com 240  $\mu$ L de solução de diacetato de 2'7'-dicloro-diidrofluoresceína ( $H_2DCF-DA$ ) na concentração de 100  $\mu$ M. O  $H_2DCF-DA$  é clivado pelas esterases celulares resultando em  $H_2DCF$ , que é oxidado por espécies reativas presentes na amostra. A última reação produz o composto fluorescente DCF que foi medido a 488 nm de excitação e 525 nm de emissão. Os resultados foram expressos por nmol de DCF formado por mg de proteína. Uma curva de calibração foi realizada utilizando DCF purificado como padrão.

## **2.6 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Os níveis de TBARS, uma medida de peroxidação lipídica, foram determinados de acordo com Ohkawa e colaboradores (1979). O sobrenadante em KCl a 1,15% foi misturado com ácido tricloroacético a 20% e ácido

tiobarbitúrico a 0,8% e foi aquecido em banho de água fervente durante 60 minutos. Os níveis de TBARS foram determinados pela absorbância a 535 nm. Os resultados foram expressos como nmol de malonaldeído (MDA) por mg de proteína.

## **2.7 Determinação do conteúdo de sulfidrilas totais**

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Aksenov e Markesbery (2001), baseando-se na redução do ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) por tióis, que por sua vez se oxidam, gerando um derivado amarelo (TNB) cuja absorção é medida espectrofotometricamente a 412 nm. Foi adicionado 50 µL de sobrenadante a 1 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,4 contendo EDTA 1 mM. A reação foi iniciada pela adição de 30 µL de DTNB 10 mM que foi após incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente (no escuro). Os resultados foram expressos como nmol TNB por mg de proteína.

## **2.8 Determinação do conteúdo de proteínas carboniladas**

As proteínas modificadas oxidativamente apresentam um aumento do conteúdo de carbonilas (Stadtman e Levine, 2003). O conteúdo destas proteínas foi avaliado por meio da reação com a dinitrofenilhidrazina, o que leva a formação de dinitrofenilhidrazona, um composto amarelo que é mensurado espectrofotometricamente a 370 nm.

Foram adicionados 100 µL do sobrenadante em tubos de plástico contendo 400 µL de dinitrofenilhidrazina 10 mM (preparada em HCl 2 M), que foram mantidos no escuro durante 1 hora e agitados em vortex a cada 15 minutos. Depois, adicionou-se a cada tubo 500 µL de ácido tricloroacético a 20%. A mistura foi agitada em vortex e centrifugada a 20000 g durante 3



minutos. O sobrenadante obtido foi descartado. Lavou-se o sedimento com 1 mL de etanol/acetato de etila (1:1 v/v), agitou-se em vórtex e centrifugou-se a 20000 g durante 3 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspenso em 600  $\mu$ L de guanidina 6 M (preparada numa solução de fosfato de potássio 20 mM pH 2,3). A amostra foi submetida a agitação e incubada a 60  $^{\circ}$ C durante 15 minutos. Após, centrifugou-se a 20000 g durante 3 minutos e mediu-se a absorbância a 370 nm (UV) em espectrofotômetro com controle de temperatura (Hitachi High Technologies America, Pleasanton, CA). Os resultados foram expressos como conteúdo de proteína carbonilada (nmol/mg de proteína).

## **2.9 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)**

O ensaio de atividade da SOD baseia-se na capacidade de auto-oxidação do pirogalo, um processo altamente dependente de superóxido, que é o substrato desta enzima. A inibição da auto-oxidação deste composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode então ser indiretamente avaliada a 420 nm (Marklund, 1985). Uma curva de calibração foi realizada utilizando-se uma SOD purificada como padrão, para calcular a atividade de SOD presente nas amostras. Os resultados foram expressos como unidades por miligrama de proteína. A atividade da SOD foi expressa como a quantidade de enzima que inibe a oxidação da epinefrina em 50%, que é igual a 1 unidade.

## **2.10 Determinação da atividade da catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi avaliada utilizando-se um espectrofotômetro de duplo feixe com controle de temperatura (Hitachi U-2001). Este método baseia-se na decomposição do  $H_2O_2$  a 240 nm num meio de reação contendo  $H_2O_2$  20

mM, Triton X-100 a 0,1%, tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 e 0,1-0,3 mg proteína/mL (Aebi, 1984). Uma unidade CAT é definida como 1 mmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumida por minuto e a atividade específica é representada como unidades CAT por mg de proteína.

### **2.11 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)**

A atividade da GPx foi medida utilizando tertbutil-hidroperóxido como substrato. O consumo de NADPH foi monitorizado a 340 nm utilizando o leitor de microplacas SpectraMax M5 (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies). O meio continha 2 mM de GSH, 0,15 U/mL de GSH redutase, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de tertbutil-hidroperóxido e 0,1 mM de NADPH. Uma unidade GPx foi definida como 1 mmol de NADPH consumido por minuto e a actividade específica é representada como unidades de GPx / mg de proteína (Wendel, 1981).

### **2.12 Proteínas totais**

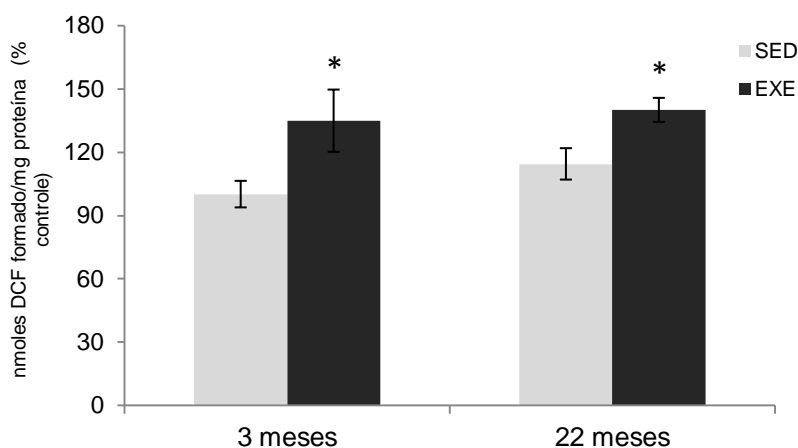
A concentração de proteínas totais foi quantificada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina como padrão.

### **2.13 Análise estatística**

Os resultados foram avaliados utilizando-se análise de variância (ANOVA) de duas ou uma via, quando adequado, seguido pelo teste *post hoc* de Duncan. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão (SE). O  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### 3.1 Conteúdo de espécies reativas

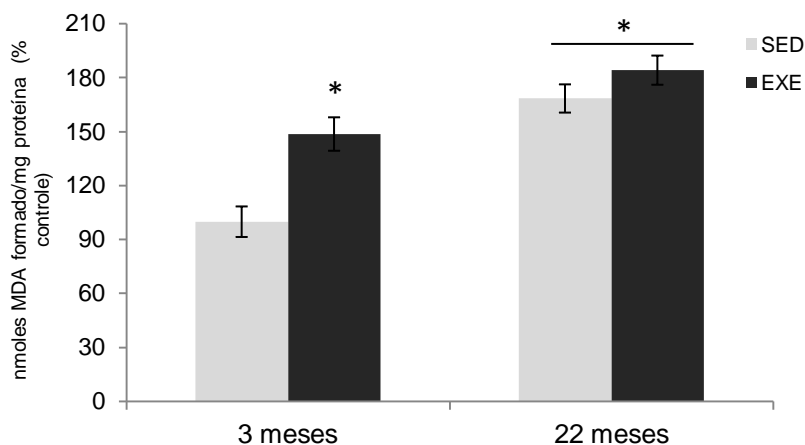
Os ratos de 3 e 22 meses submetidos ao exercício de corrida em esteira apresentaram um aumento dos níveis de espécies reativas no músculo sóleo quando comparados ao grupo jovem controle (Figura 2;  $F_{(1,19)}= 12.46$ ;  $p<0.05$ ).



**Figura 2.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de espécies reativas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade ( $n= 5$  por grupo). Os resultados, calculados em nmoles de DCF formado por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*Valores significativamente diferentes do grupo controle;  $p<0,05$ .

### 3.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

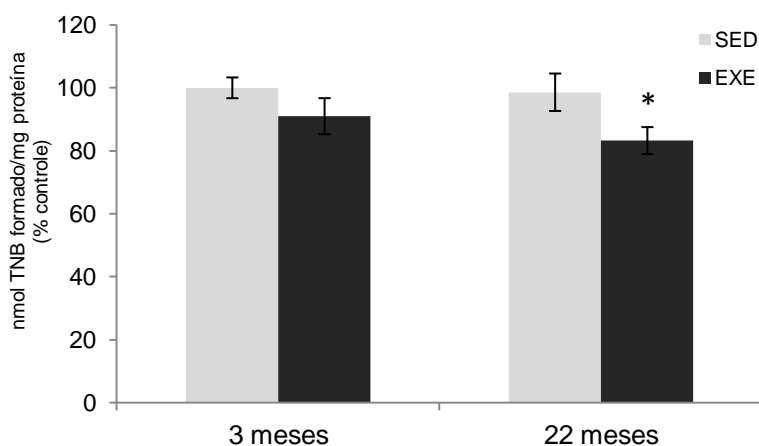
Os ratos de 3 meses submetidos ao exercício físico apresentaram um aumento da lipoperoxidação no músculo sóleo quando comparados ao grupo controle (3 meses SED) (Figura 3;  $F_{(1,21)}= 13,34$ ;  $p<0,05$ ). Um achado interessante, foi que o envelhecimento levou a um aumento da lipoperoxidação basal no músculo sóleo ( $F_{(1,21)}= 34,73$ ;  $p<0,05$ ), enquanto que o exercício não teve efeito nos animais de 22 meses.



**Figura 3.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade (n= 5-7 por grupo). Os resultados, calculados em nmoles de MDA formado por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*Valores significativamente diferentes do grupo controle;  $p < 0,05$ .

### 3.3 Conteúdo de sulfidrilas totais

Conforme demonstrado na figura 4, o exercício físico reduziu o conteúdo de sulfidrilas no músculo sóleo dos ratos de 22 meses quando comparado ao grupo controle ( $F_{(1,20)} = 5,67$ ;  $p < 0,05$ ), mas não alterou o conteúdo de sulfidrilas nos animais de 3 meses.

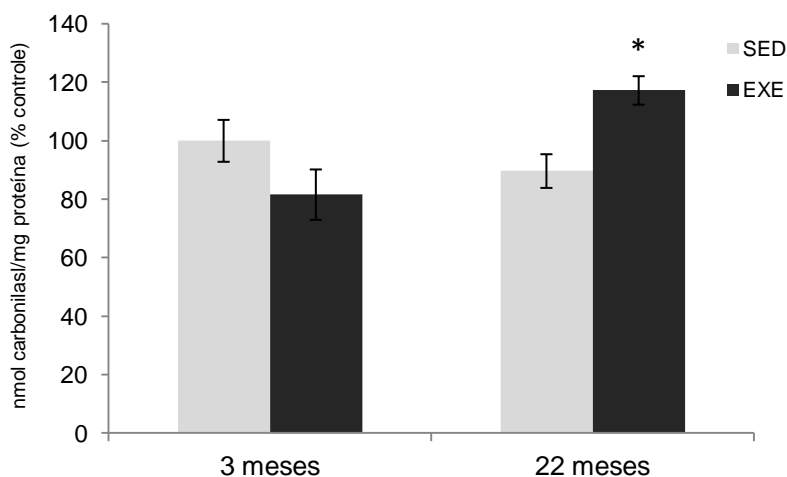


**Figura 4.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de sulfidrilas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade (n= 5-6 por grupo). Os resultados, calculados em nmoles de TNB formado por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo

controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*Valores significativamente diferentes do grupo controle;  $p < 0,05$ .

### 3.4 Conteúdo de proteínas carboniladas

Corroborando com os resultados do conteúdo de sulfidrilas, os ratos de 22 meses submetidos ao exercício físico apresentaram um aumento no conteúdo de proteínas carboniladas no músculo sóleo quando comparado ao grupo controle (Figura 5;  $F_{(1,20)} = 10,38$ ;  $p < 0,05$ ); contudo, não foram observadas diferenças nos ratos de 3 meses.

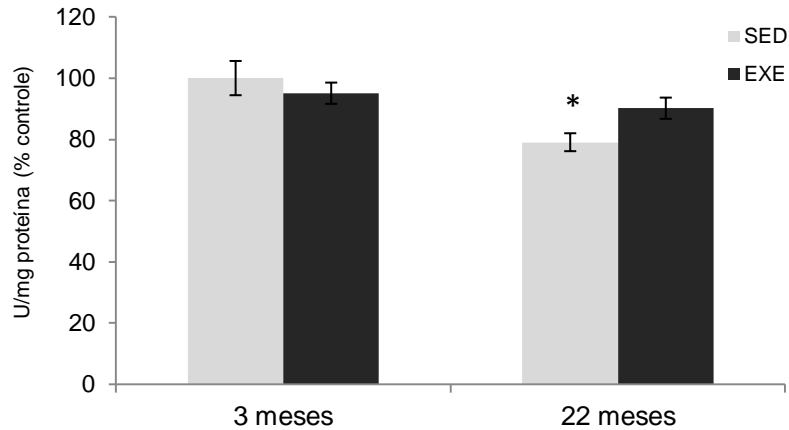


**Figura 5.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre o conteúdo de proteínas carboniladas no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade ( $n = 5-6$  por grupo). Os resultados, calculados em nmoles de carbonilas formado por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*Valores significativamente diferentes do grupo controle;  $p < 0,05$ .

### 3.5 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Os ratos de 22 meses apresentaram uma redução na atividade da enzima SOD no músculo sóleo quando comparado ao grupo controle (Figura 6;  $F_{(1,25)} = 11,58$ ;  $p < 0,05$ ); contudo, o exercício reverteu parcialmente esse efeito

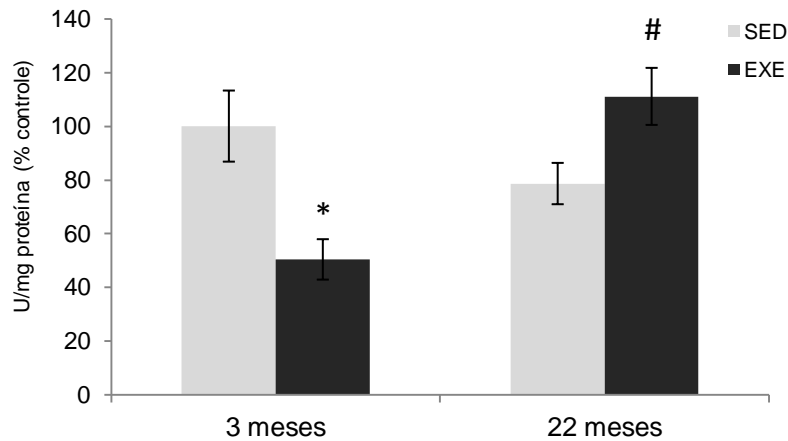
do envelhecimento ( $F_{(1,25)} = 4,47$ ;  $p < 0,05$ ). O exercício não alterou a atividade da SOD no músculo sóleo dos ratos de 3 meses.



**Figura 6.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da SOD no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade ( $n = 5-7$  por grupo). Os resultados, calculados em unidades (U) por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*Valores significativamente diferentes do grupo controle;  $p < 0,05$ .

### 3.6 Atividade da catalase (CAT)

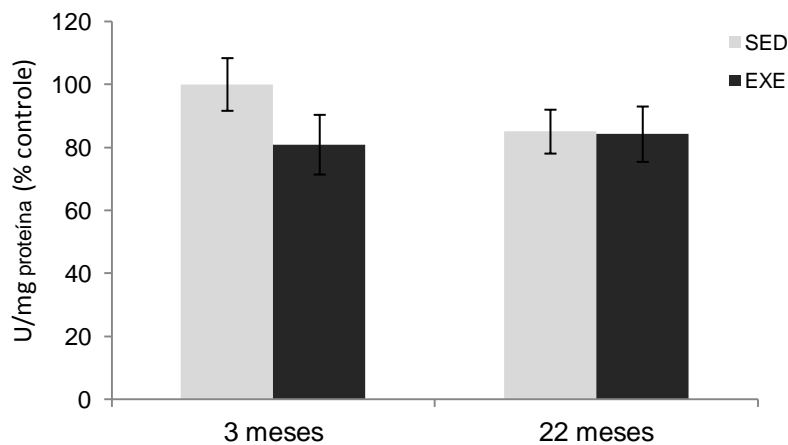
Os ratos de 3 meses submetidos ao exercício físico mostraram uma redução na atividade da enzima CAT no músculo sóleo em relação ao grupo controle (3 meses SED) (Figura 7;  $F_{(1,20)} = 18,15$ ;  $p < 0,05$ ). O grupo 22 meses SED não apresentou diferenças em relação aos grupos 3 meses SED e EXE, mas foi diferente do grupo envelhecido exercitado ( $F_{(1,20)} = 4,16$ ;  $p < 0,05$ ).



**Figura 7.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da CAT no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade (n= 4-6 por grupo). Os resultados, calculados em unidades (U) por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*Valores significativamente diferentes do grupo controle;  $p < 0,05$ . #Valores significativamente diferentes do grupo 22 meses SED e iguais aos do grupo controle;  $p < 0,05$ .

### 3.7 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

Não foram observadas diferenças em relação a atividade da enzima GPx no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade submetidos ou não ao exercício de corrida em esteira (Figura 8).



**Figura 8.** Efeito do exercício de corrida em esteira sobre a atividade da GPx no músculo sóleo de ratos de 3 e 22 meses de idade (n= 4-6 por grupo). Os resultados, calculados em unidades

(U) por mg de proteína, estão expressos como porcentagem do grupo controle (3 meses SED). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

#### **4. DISCUSSÃO**

Sabendo-se que as alterações induzidas pelo envelhecimento ocorrem nos diferentes tecidos do organismo e que o exercício tem efeito direto sobre o músculo esquelético, o objetivo desse Capítulo foi avaliar o efeito do exercício físico moderado sobre o estado oxidativo celular no músculo sóleo de ratos senescentes que apresentaram uma melhora do desempenho cognitivo na tarefa de memória espacial.

De acordo com a hipótese de trabalho desta tese, o exercício físico induziu o aumento do estresse oxidativo no músculo esquelético sóleo de ratos jovens e envelhecidos; no entanto, este aumento foi maior no sóleo dos animais envelhecidos, que apresentou acentuado dano às proteínas. É possível que as diferenças observadas entre os ratos jovens e envelhecidos estejam relacionadas com o fato de que a capacidade de adaptação do sistema de defesa antioxidante no músculo frente as alterações do estado oxidativo como consequência do exercício seja diferente nos ratos senescentes, conforme previamente demonstrado por outros autores (Ji, 2008; Barbieri e Sestili, 2011).

No presente estudo, os animais envelhecidos não apresentaram alterações no conteúdo de espécies reativas no músculo sóleo em relação aos ratos jovens. Contudo, exercício físico moderado induziu o aumento do conteúdo destas espécies no sóleo dos ratos de ambas as idades. Neste contexto, Bejma e Ji (1999) relataram que o exercício agudo aumentou significativamente o conteúdo de espécies reativas no músculo vasto lateral profundo de ratas de 25 meses de idade, quando comparado aos animais



adultos. Conforme demonstrado na figura 3, foi observado um aumento da lipoperoxidação associado à idade no músculo sóleo dos ratos de 22 meses. Corroborando com este resultado, alguns estudos demonstraram o aumento da lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos envelhecidos (Günduz *et al.*, 2004; Lambertucci *et al.*, 2007). O exercício físico moderado aumentou a lipoperoxidação no músculo sóleo dos ratos jovens, resultado que está de acordo com o aumento do conteúdo de espécies reativas, mas não alterou este parâmetro nos animais envelhecidos. De acordo com esses dados, foi demonstrado que o exercício de baixa intensidade durante 13 semanas levou ao aumento da lipoperoxidação no sóleo de ratos de 2 meses de idade, enquanto que promoveu uma redução da lipoperoxidação associada à idade em ratos de 21 meses (Lambertucci *et al.*, 2007). Por outro lado, Bejma e Ji (1999) relataram que o exercício agudo aumentou a lipoperoxidação no músculo vasto lateral profundo de ratas adultas e envelhecidas.

Em relação à avaliação do dano às proteínas, os resultados mostram que os ratos de 22 meses exercitados apresentaram uma redução no conteúdo de sulfidrilas totais e um aumento no conteúdo de proteínas carboniladas, demonstrando que o exercício está relacionado com o aumento do dano às proteínas nos animais envelhecidos. Neste sentido, foi demonstrado que o exercício agudo de corrida em esteira (Reznick *et al.*, 1992) e que o treino de resistência durante 12 semanas (Witt *et al.*, 1992) induziram aumento significativo na oxidação de proteínas no músculo esquelético de ratos. Contudo, o exercício não alterou o conteúdo de sulfidrilas totais e de proteínas carboniladas no sóleo dos ratos jovens, resultado semelhante ao previamente descrito por Bejma e Ji (1999).

Entre os mecanismos de defesa do organismo, as enzimas antioxidantes são consideradas a defesa primária para prevenir as macromoléculas biológicas do dano oxidativo (Siqueira *et al.*, 2005), sendo a SOD a enzima responsável por converter o  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ . A figura 6 mostra que os ratos de 22 meses apresentaram uma redução na atividade da SOD no músculo sóleo. Em contrapartida, alguns estudos demonstram que não há alteração no conteúdo ou na atividade desta enzima no sóleo de roedores envelhecidos (Hollander *et al.*, 2000; Günduz *et al.*, 2004; Vasilaki *et al.*, 2006), enquanto outros mostram que há o aumento na atividade da SOD no músculo sóleo com o envelhecimento (Oh-Ishi *et al.*, 1995; Lambertucci *et al.*, 2007). Esses resultados conflitantes em relação à atividade da SOD no músculo de animais envelhecidos podem ser decorrentes das diferenças entre as linhagens de roedores, das condições de manutenção e dos procedimentos experimentais, ou mesmo podem refletir a formação do seu substrato, o  $O_2^{\cdot-}$ , uma vez que a atividade desta enzima também pode ser induzida pelo estresse peroxidativo (Benzi e Moretti, 1995).

Os resultados demonstram que o exercício físico moderado promoveu um aumento na atividade da SOD no sóleo dos ratos envelhecidos. Pinho e colaboradores (2006) relataram um aumento da atividade da SOD nos músculos quadríceps e gastrocnêmio de ratos de 8-12 meses após o exercício de corrida em esteira durante 12 semanas. Além disso, Tromm e colaboradores (2016) relataram um aumento da atividade da SOD em ratos de 24 meses de idade submetidos ao exercício de corrida quando comparado aos animais sedentários de mesma idade.

Ainda em relação às enzimas antioxidantes, o  $H_2O_2$  formado na reação catalisada pela SOD poderá ser convertido em água pela ação das enzimas

antioxidantes CAT ou GPx. No presente estudo, não foram observadas alterações relacionadas à idade na atividade da CAT no músculo sóleo de ratos. De acordo com esse resultado, Hollander e colaboradores (2000) também não encontraram alterações no conteúdo desta proteína no sóleo de ratos de 25 meses em comparação aos animais jovens. No entanto, alguns estudos demonstram que há um aumento na atividade da CAT no músculo sóleo com a idade (Günduz *et al.*, 2004; Lambertucci *et al.*, 2007). Conforme demonstrado na figura 7, o exercício físico moderado reduziu a atividade da CAT nos ratos jovens, enquanto promoveu um aumento da sua atividade nos ratos envelhecidos em relação aos animais sedentários de mesma idade. De maneira semelhante, Pinho e colaboradores (2006) relataram uma redução na atividade da CAT nos músculos quadríceps e gastrocnêmio de ratos adultos submetidos ao exercício.

A figura 8 mostra o efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre a atividade da GPx no músculo sóleo de ratos. Contudo, não foram observados efeitos das variáveis estudadas sobre a atividade desta enzima. De acordo com esses resultados, Günduz e colaboradores (2004) também não observaram alterações na atividade da GPx no sóleo de ratos de envelhecidos. Além disso, Lambertucci e colaboradores (2007) não encontraram efeito do protocolo de exercício físico utilizado sobre a atividade da GPx no músculo de ratos envelhecidos (Günduz *et al.*, 2004; Lambertucci *et al.*, 2007).

Diante do exposto, os resultados obtidos para os animais jovens demonstram que, embora eles sejam susceptíveis ao aumento do estresse oxidativo no músculo em resposta ao exercício físico, evidenciado pelo aumento do conteúdo de espécies reativas e da lipoperoxidação; é importante ressaltar que este protocolo de exercício não alterou os parâmetros de dano

oxidativo às proteínas nestes animais. Assim, considerando que o exercício não aumentou a atividade das enzimas antioxidantes no músculo dos ratos jovens, é possível sugerir que existam mecanismos de compensação de outros sistemas, como o sistema de defesa antioxidante não enzimático, a fim de evitar o dano oxidativo às proteínas como resultado do exercício físico.

Em conjunto, os resultados do **Capítulo III** demonstram: I) o aumento da lipoperoxidação e a redução na atividade da enzima SOD relacionado à idade no músculo sóleo; II) o aumento do conteúdo de espécies reativas e da lipoperoxidação, e a redução na atividade da enzima CAT induzido pelo exercício no sóleo de ratos de 3 meses; III) o aumento do conteúdo de espécies reativas e do dano às proteínas, bem como o aumento na atividade das enzimas SOD e CAT induzidos pelo exercício no sóleo de ratos de 22 meses. Estes resultados sugerem que o envelhecimento está relacionado com algumas alterações do estado oxidativo celular no músculo sóleo. Além disso, demonstram que o sóleo dos ratos de 22 meses é mais sensível do que dos ratos de 3 meses às alterações do estado oxidativo celular induzidas pelo exercício físico, possivelmente devido à capacidade de adaptação reduzida do sistema de defesa antioxidante relacionado ao envelhecimento.

## **6. DISCUSSÃO**

A presente tese teve por objetivo investigar os efeitos do exercício físico moderado sobre a memória e sobre parâmetros bioquímicos e moleculares no hipocampo e no músculo esquelético sóleo de ratos senescentes. Mais especificamente, as diferenças em relação ao desempenho nas tarefas de memória espacial entre ratos jovens e envelhecidos foram analisadas e comparadas, assim como os possíveis mecanismos moleculares para explicar os efeitos benéficos do exercício sobre a função cerebral nos animais envelhecidos.

O envelhecimento é um processo biológico dependente do tempo e que produz alterações físicas e anatômicas que reduzem a atividade fisiológica e bioquímica de muitos órgãos (Farooqui and Farooqui, 2009; Hung *et al.*, 2010). Neste sentido, o envelhecimento pode estar associado com alterações funcionais e estruturais no hipocampo (Rosenzweig e Barnes, 2003), uma estrutura que é fundamental para funções cognitivas como aprendizado e memória. Assim, alguns estudos em roedores têm demonstrado que durante o envelhecimento há uma redução do desempenho cognitivo, a qual parece estar associada com o comprometimento da transmissão sináptica, alteração dos níveis de neurotransmissores (Haider *et al.*, 2014) e também com a redução da neurogênese hipocampal (Fabel *et al.*, 2003). O aumento das espécies reativas no cérebro durante o envelhecimento é um ponto importante a ser considerado, uma vez que, devido a sua alta taxa metabólica e sua capacidade de regeneração celular diminuída em relação a outros órgãos, o cérebro é mais susceptível aos efeitos danosos do estresse oxidativo; além disso, o aumento dos níveis de espécies reativas relacionado à idade tem sido frequentemente associado ao declínio da função cognitiva (Fukui *et al.*, 2002; Mulero *et al.*, 2011).

O **Capítulo I** investigou o efeito do exercício físico moderado sobre a função cognitiva de ratos Wistar machos de 3 e 22 meses de idade na tarefa de memória de referência no Water maze, bem como o efeito do exercício sobre parâmetros de estresse oxidativo tais como o conteúdo de espécies reativas, lipoperoxidação, atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e também na expressão de fatores neurotróficos como BDNF, NT-3, IGF-1 e VEGF no hipocampo. Confirmando dados de estudos prévios (Socci *et al.*, 1995; Taridi *et al.*, 2014), os resultados demonstraram que os animais envelhecidos apresentaram déficit de aquisição da memória de referência. Contudo, o exercício físico preveniu esse declínio cognitivo relacionado à idade, melhorando o desempenho dos ratos envelhecidos na tarefa de memória espacial. De acordo com esses achados, Sampedro-Piquero e colaboradores (2013) demonstraram que o exercício voluntário em uma roda de corrida durante 2 meses melhorou a memória espacial em ratos envelhecidos e outro estudo relatou que o exercício de corrida durante 12 semanas melhorou a memória aversiva e de reconhecimento em animais senescentes (Flôres *et al.*, 2014).

Considerando a necessidade de um melhor entendimento sobre os mecanismos pelos quais o exercício físico exerce seus efeitos positivos sobre a função cognitiva durante o envelhecimento, neste primeiro Capítulo investigamos inicialmente a sua relação com o estresse oxidativo e com a expressão de alguns fatores neurotróficos no hipocampo.

Evidências de estudos em animais demonstram o envolvimento das espécies reativas durante o processo de envelhecimento e sua relação com o declínio da função cognitiva (Fukui *et al.*, 2001, 2002; Mulero *et al.*, 2011). Foi observado um aumento do estresse oxidativo no hipocampo dos ratos

envelhecidos, avaliado pelo aumento do conteúdo de espécies reativas e de lipoperoxidação, enquanto que os animais de mesma idade que foram submetidos ao exercício físico apresentaram uma redução significativa destes parâmetros. Os resultados também demonstram uma correlação positiva importante entre o conteúdo espécies reativas e da lipoperoxidação no hipocampo com a latência (tempo) dos ratos envelhecidos exercitados para encontrar a plataforma no quinto dia de treino na tarefa de memória de referência no Water maze; ou seja, a redução dos parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo pode estar associada com melhora da memória relacionada ao exercício. Esta correlação é realizada utilizando-se o desempenho dos animais no último dia de treino da fase de aquisição da memória de referência (quinto dia), porque é normalmente quando se observa a diferença máxima da latência em relação ao primeiro dia. No entanto, não houve alteração na razão entre as enzimas antioxidantes SOD e CAT, o que demonstra que o exercício pode estar atuando sobre o dano oxidativo através de diferentes vias moleculares.

Com vistas ao entendimento dos efeitos benéficos do exercício físico sobre a memória, grande atenção tem sido dada a sinalização mediada por fatores neurotróficos. Esses fatores são proteínas importantes que estão envolvidas com diversas funções que incluem a manutenção da sobrevivência e diferenciação celular, transmissão sináptica, aumento da resistência ao estresse oxidativo e memória (Guo e Mattson, 2000; Leeds *et al.*, 2005; Klumpp *et al.*, 2006). Os resultados mostram que o exercício físico aumentou a expressão dos fatores neurotróficos BDNF, NT-3 e IGF-1 no hipocampo de ratos envelhecidos, mas não alterou a expressão do VEGF. De acordo com esses resultados, estudos demonstram que o exercício pode modular a



expressão de fatores neurotróficos mesmo quando iniciado em uma idade mais avançada (Van Praag *et al.*, 2005). O BDNF e o IGF-1 têm sido muito estudados nos últimos anos e vários estudos demonstraram que ambos desempenham funções cruciais na melhora da memória em resposta ao exercício (Trejo *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que existe uma correlação positiva entre os níveis de atividade física e a expressão do RNA mensageiro do BDNF no hipocampo de ratos (Neeper *et al.*, 1996). Ding e colaboradores (2006) relataram que o aumento do BDNF hipocampal pelo exercício também é mediado pelo IGF-1. A expressão do gene do IGF-1 é aumentada nos neurônios hipocâmpais em resposta ao exercício, assim como os níveis de IGF-1 circulantes, que parecem ser essenciais para a neurogênese (Trejo *et al.*, 2001) e para a facilitação da memória induzida pelo exercício em ratos (Ding *et al.*, 2006).

O aumento da expressão de NT-3 pelo exercício observado neste trabalho é de grande relevância, pois há evidências que demonstram a sua importância para a função cognitiva durante o envelhecimento, especialmente no hipocampo (Kaisho *et al.*, 1999; Bimonte *et al.*, 2003). Foi relatado que a infusão intracerebroventricular de NT-3 melhorou o aprendizado espacial em ratos envelhecidos (Fischer *et al.*, 1994) e que a superexpressão desta neurotrofina em camundongos transgênicos preveniu o declínio de memória espacial associado à idade (Kaisho *et al.*, 1999). Este resultado é a primeira evidência de que o exercício físico aumenta a expressão de NT-3 no hipocampo de ratos envelhecidos e sugere que, a regulação dos fatores neurotróficos juntamente com a redução do estresse oxidativo, pode ser um mecanismo importante por meio do qual o exercício físico pode estar

promovendo seus efeitos positivos sobre o desempenho da memória relacionado à idade.

Para melhor compreender os efeitos benéficos do exercício físico sobre a memória demonstrados no primeiro trabalho, assim como do possível envolvimento do treinamento cognitivo sobre os parâmetros bioquímicos analisados, no **Capítulo II** estudamos o efeito do exercício físico moderado sobre a função cognitiva de ratos Wistar machos de 3, 6 e 22 meses de idade através da avaliação da memória de referência e da memória de trabalho na tarefa de Water maze, investigando também a atividade das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e AChE no hipocampo dos ratos após o treinamento cognitivo ou após o exercício físico combinado com o treinamento cognitivo.

Estudos sugerem que o declínio cognitivo que ocorre durante envelhecimento está relacionado com alterações bioquímicas no cérebro, em especial no hipocampo (Carageorgiou *et al.*, 2008; Lovatel *et al.*, 2013; Haider *et al.*, 2014). O funcionamento adequado desta estrutura também depende de enzimas de membrana que mostram ter um papel importante para a função cognitiva, como é o caso da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (Wyse *et al.*, 2004; dos Reis-Lunardelli *et al.*, 2007). Foi demonstrado que roedores deficientes de uma isoforma específica da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase apresentaram um pior desempenho da memória espacial (Moseley *et al.*, 2007). Além disso, também foi relatado que o treinamento cognitivo em tarefas de memória, como o T-maze, pode promover o aumento da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo (Heo *et al.*, 2012). Além da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, particular atenção tem sido dada a enzima AChE, especialmente devido ao envolvimento do sistema colinérgico com sintomas cognitivos observados durante o envelhecimento (Haider *et al.*, 2014).




Neste segundo Capítulo, corroborando com os resultados apresentados no Capítulo anterior, foi demonstrado que o exercício físico moderado preveniu os déficits de memória espacial de referência e de trabalho relacionados à idade. Neste estudo, também demonstramos que o treinamento cognitivo no Water maze aumentou a atividade das enzimas  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e AChE no hipocampo de ratos de 6 e 22 meses de idade. É importante ressaltar que o aumento na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase foi ainda maior nos ratos de 22 meses que foram submetidos ao exercício físico combinado com o treinamento cognitivo. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo dos ratos de 22 meses exercitados e a latência para encontrar a plataforma no quinto dia de treino na tarefa de memória de referência, ou seja, o aumento da atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase está associado com a melhora do desempenho de memória relacionado ao exercício físico nos animais envelhecidos. De acordo com esses dados, também foi observada uma correlação positiva entre a atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase e a diferença (delta) entre a média das latências entre os trials 1 e 4 na tarefa de memória de trabalho, demonstrando que os ratos envelhecidos exercitados apresentaram um melhor desempenho na tarefa de memória de trabalho associado com o aumento na atividade da  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase.

Sabe-se que o sistema colinérgico desempenha uma importante função no cérebro durante o processo de aprendizado e memória e é o principal sistema neurotransmissor envolvido com sintomas cognitivos do envelhecimento (Hosseini-Sharifabad *et al.*, 2011; Haider *et al.*, 2014). Assim, a AChE, uma importante enzima deste sistema, tem sido muito estudada como alvo terapêutico, especialmente para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer. Neste estudo foi observado

uma redução na atividade da AChE no hipocampo de ratos senescentes quando comparado aos jovens, um resultado que está de acordo com os dados da literatura e demonstram que a atividade desta enzima está diminuída no cérebro envelhecido (Carageorgiou *et al.*, 2008; Haider *et al.*, 2014). Além disso, os resultados mostram que o treinamento cognitivo aumentou a atividade da AChE no hipocampo dos ratos em todas as idades, o que pode estar relacionado com o aumento da liberação de ACh, que também ocorre como resultado do treinamento cognitivo (Ragozzino *et al.*, 1996; Stancampiano *et al.*, 1999). É possível que o treinamento cognitivo tenha melhorado a função da AChE, uma vez que foi demonstrado que o aprendizado em uma tarefa espacial modifica a função dos neurônios colinérgicos, tornando-os mais ativos (Fadda *et al.*, 2000) e também aumenta a imunorreatividade dos receptores muscarínicos (Van der Zee *et al.*, 1995). Contudo, a atividade da AChE não foi alterada pelo exercício físico combinado com o treinamento cognitivo.

Considerando as fortes correlações observadas entre o desempenho nas tarefas de memória e a atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo dos ratos envelhecidos exercitados, podemos sugerir que o aumento da atividade desta enzima pode, pelo menos em parte, explicar a prevenção do declínio cognitivo relacionado à idade mediada pelo exercício físico.

Em linhas gerais (vide Figura 5), os resultados dos **Capítulos I e II** demonstram que o exercício físico preveniu o declínio da memória espacial relacionado à idade, um efeito provavelmente mediado por fatores que incluem a redução do estresse oxidativo, o aumento da expressão de fatores neurotróficos e o aumento da atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo de ratos envelhecidos.

ATIVIDADE FÍSICA (SED/EXE)		
	JOVEM _____	
	-----	
	SENESCENTE	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>↓ Memória</p> <p>↓ AChE</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>↑ Espécies reativas</p> <p>↑ LPO</p> </div> </div>
	JOVEM _____	
	SENESCENTE	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>↑ Memória</p> <p>↓ Espécies reativas</p> <p>↓ LPO</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>↑ BDNF, IGF-1, NT-3</p> <p>↑ Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase</p> </div> </div>

**Figura 5.** Efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre a memória, parâmetros de estado oxidativo celular, expressão de fatores neurotróficos e atividade das enzimas AChE e Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase no hipocampo de ratos de 3 (jovens) e 22 meses (senescentes) de idade (LPO; lipoperoxidação).





Tendo em vista que os efeitos do envelhecimento e do exercício físico afetam o organismo como um todo, no Capítulo I desta tese avaliamos os efeitos do envelhecimento e do exercício sobre alguns parâmetros de estado oxidativo celular no hipocampo de ratos de 3 e de 22 meses e no Capítulo III decidimos investigar parâmetros semelhantes no músculo sóleo destes mesmos animais.

Os resultados demonstram que o cérebro é mais sensível do que o músculo sóleo às alterações do estado oxidativo celular relacionadas à idade, visto que foi observado um aumento no conteúdo de espécies reativas e da lipoperoxidação no hipocampo, enquanto apenas a lipoperoxidação foi aumentada no sóleo dos ratos envelhecidos. Para melhor compreender esses resultados, devemos levar em consideração as diferenças que existem entre os dois órgãos, principalmente no que se refere à proporção de biomoléculas

(especialmente de lipídeos e proteínas), estrutura celular, necessidades energéticas e tipo de metabolismo. Como cérebro é um órgão que apresenta alta taxa metabólica, são necessárias grandes quantidades de O<sub>2</sub> para a regeneração do ATP, que é essencial para as células neuronais (Espinnet *et al.*, 2015). No entanto, esse consumo elevado de O<sub>2</sub> pode aumentar a geração de espécies reativas e deixar o cérebro mais susceptível ao estresse oxidativo, além de resultar no acúmulo de dano oxidativo com o envelhecimento (Farooqui and Farooqui, 2009).

Em relação aos efeitos da atividade física, sabe-se que o exercício aumenta a exigência metabólica dos músculos (Powers e Jackson, 2008). Além disso, o músculo esquelético parece ser o principal local de geração de radicais livres e espécies reativas de oxigênio durante o exercício, pois nele existem muitos sítios de geração destas espécies como a mitocôndria, o retículo sarcoplasmático e a membrana plasmática (Powers e Jackson, 2008).

Nesta tese observamos que o músculo foi mais susceptível do que o cérebro ao aumento do estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, possivelmente devido a ação direta do exercício sobre o tecido muscular. Enquanto o protocolo de exercício físico utilizado foi benéfico para a função cognitiva de ratos envelhecidos, este mesmo protocolo de exercício levou ao aumento no conteúdo espécies reativas e da lipoperoxidação no sóleo de ratos jovens, bem como aumentou os níveis de espécies reativas no sóleo dos ratos envelhecidos (Figura 6).

		
	JOVEM _____	_____
	-----	-----
	SENESCENTE ↑ Espécies reativas ↑ LPO	↑ LPO
	JOVEM _____	↑ Espécies reativas ↑ LPO
	-----	-----
	SENESCENTE ↓ Espécies reativas ↓ LPO	↑ Espécies reativas

**Figura 6.** Efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre parâmetros de estado oxidativo celular no hipocampo e no músculo sóleo de ratos de 3 (jovens) e 22 meses (senescentes) de idade (LPO, lipoperoxidação).

Embora o cérebro, diferentemente do músculo, seja um tecido não contrátil, o aumento do metabolismo energético induzido pelo exercício parece influenciar indiretamente a função neuronal (Dishman *et al.*, 2006). Desta forma, é possível que os diferentes efeitos do exercício físico observados no cérebro e no músculo estejam relacionados ao fato de que o exercício pode induzir um aumento transitório na transcrição de genes metabólicos no músculo esquelético, conforme demonstrado por Pilegaard e colaboradores (2000) em um estudo realizado em humanos. Este aumento na transcrição de genes metabólicos pode levar à alterações no conteúdo e na atividade de enzimas oxidativas no músculo, que por sua vez, podem limitar o uso de glicose e ter efeitos indiretos no metabolismo cerebral, protegendo o cérebro do aumento das necessidades metabólicas durante e após o exercício (Pilegaard *et al.*, 2000).

Em resumo, considerando os efeitos do exercício físico moderado sobre o organismo de maneira geral, os resultados desta tese demonstram que o exercício preveniu os déficits de memória relacionados ao envelhecimento, um efeito provavelmente mediado pela redução do estresse oxidativo, pelo aumento da expressão de fatores neurotróficos e pelo aumento na atividade da enzima  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase no hipocampo de ratos envelhecidos. Contudo, o exercício não melhorou os parâmetros avaliados no músculo sóleo dos animais envelhecidos que demonstraram melhora da função cognitiva. Em conjunto, estes dados reforçam a relevância do exercício físico como uma estratégia terapêutica não farmacológica importante para a prevenção do declínio cognitivo relacionado à idade.



## **7. CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos nesta tese nos permitem concluir que:

- I. O exercício físico moderado preveniu o declínio de memória relacionado à idade na tarefa de memória de referência no Water maze, bem como preveniu o aumento no conteúdo de espécies reativas e da lipoperoxidação relacionadas à idade no hipocampo e promoveu o aumento da expressão de BDNF, NT-3 e IGF-1 no hipocampo de ratos de 22 meses de idade. A redução do estresse oxidativo pelo exercício está correlacionada com um melhor desempenho da memória nos ratos de 22 meses.
  
- II. O exercício físico moderado preveniu o declínio da aquisição da memória espacial de referência e de trabalho em ratos de 22 meses. O treinamento cognitivo no Water maze aumentou a atividade das enzimas  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase e AChE no hipocampo de ratos de 6 e 22 meses de idade. Os ratos de 22 meses que foram submetidos ao exercício físico combinado com o treinamento cognitivo apresentaram um aumento ainda maior na atividade da enzimas  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase no hipocampo. O aumento da atividade desta enzima está correlacionado com um melhor desempenho da memória nos ratos de 22 meses.
  
- III. O exercício físico moderado aumentou o conteúdo de espécies reativas e a lipoperoxidação no músculo sóleo de ratos de 3 meses. Ratos de 22 meses apresentaram aumento da lipoperoxidação e redução na atividade da CAT. O exercício induziu o aumento dos níveis de espécies reativas, redução no conteúdo de sulfidrilas e aumento de proteínas

carboniladas no sóleo dos ratos de 22 meses; contudo, promoveu o aumento da atividade das enzimas SOD e CAT. Esses dados sugerem que o músculo sóleo dos ratos de 22 meses é mais sensível do que o sóleo dos ratos de 3 meses às alterações do estado oxidativo celular induzidas pelo exercício físico.

## **8. PERSPECTIVAS**

Investigar o efeito do exercício físico moderado sobre o sistema de defesa antioxidante não enzimático, como glutathione (GSH), potencial antioxidante total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR) no músculo sóleo de ratos senescentes, bem como avaliar o efeito do exercício sobre a composição de fibras musculares no sóleo destes animais.

## **9. BIBLIOGRAFIA**

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, *Neuroscience Letters*, 406, pp. 148–151.

Adams, G., Haddad, F., Baldwin, K. (1994) Interaction of chronic creatine depletion and muscle unloading: effects on postural locomotor muscles', *Journal of Applied Physiology*, 77, pp. 1198–1205.

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105, pp. 121–126.

Ahlskog, J.E., Geda, Y.E., Graff-Radford, N.R., Petersen, R.C. (2011) Physical Exercise as a Preventive or Disease-Modifying Treatment of Dementia and Brain Aging, *Mayo Clinic Proceedings*, 86, pp. 876–884.

Aine, C.J., Bryant, J.E., Knoefel, J.E., Adair, J.C., Hart, B., Donahue, C.H., Montaña, R., Hayek, R., Qualls, C., Ranken, D., et al. (2010) Different strategies for auditory word recognition in healthy versus normal aging, *NeuroImage*, 49, pp. 3319–3330.

Aksenov, M.Y., Markesbery, W.R. (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease, *Neuroscience Letters*, 302, pp. 141–145.

Aksu, I., Topcu, A., Camsari, U.M., Acikgoz, O. (2009) Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum, *Neuroscience Letters*, 452, pp. 281–285.

American College of Sports Medicine (1998) A quantidade e o tipo recomendados de exercícios para o desenvolvimento e a manutenção da aptidão cardiorrespiratória e muscular em adultos saudáveis, *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 3, pp. 96-106.

Andersen, J.K. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or

consequence?, *Nature Medicine*, 10, pp. S18-25.

Ang, E.T., Gomez-Pinilla, F. (2007) Potential therapeutic effects of exercise to the brain, *Current Medicinal Chemistry*, 14, pp. 2564–2571.

Araujo, D.M., Lapchak, P., Meaney, M.J., Collier, B., Quirion, R. (1990) Effects of aging on Nicotinic in the rat brain: Relationship markers and binding sites and Muscarinic to presynaptic autoreceptor cholinergic function, *The Journal of Neuroscience*, 10, pp. 3069–3078.

Arteni, N.S., Salgueiro, J., Torres, I., Achaval, M., Netto, C.A. (2003) Neonatal cerebral hypoxia-ischemia causes lateralized memory impairments in the adult rat, *Brain Research*, 973, pp. 171–178.

Astrand, P.O., Hultman, E., Juhlin-Dannfelt, A., Reynolds, G. (1986) Disposal of lactate during and after strenuous exercise in humans, *Journal of applied physiology*, 61, pp. 338–43.

Balagopal, P., Schimke, J. C., Ades, P., Adey, D., Nair, K. S. (2001) Age effect on transcript levels and synthesis rate of muscle MHC and response to resistance exercise, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 280, pp. E203–E208.

Barbieri, E., Sestili, P. (2011) Reactive oxygen species in skeletal muscle signaling, *Journal of signal transduction*, 2012, p. 1-17.

Barstow, T., Jones, A., Nguyen, P., Casaburi, R. (1996) Influence of muscle fiber type and pedal frequency on oxygen uptake kinetics of heavy exercise, *Journal of applied physiology*, 81, pp. 1642–1650.

Bartus, R.T., Dean, R.L., Beer, B., Lippa, A.S. (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction, *Science*, 217, pp. 408–417.

Bartsch, T., Wulff, P. (2015) Editorial the hippocampus in aging and disease: from plasticity to vulnerability, *Neuroscience*, 309, pp. 1–16.



Bejma, J., Ji, L. (1999) Rapid Communication, *The American Physiological Society*, pp. 465–470.

Ben, J., Soares, F.M.S., Cechetti, F., Vuaden, F.C., Bonan, C.D., Netto, C.A., Wyse, A.T.S. (2009) Exercise effects on activities of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats, *Brain Research*, 1302, pp. 248-255.

Benzi, G., Moretti, A. (1995) Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system, *Free Radical Biology and Medicine*, 19, pp. 77-101.

Berchtold, N., Chinn, G., Chou, M., Kesslak, J., Cotman C.W. (2005) Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus, *Neuroscience*, 133, pp. 853–861.

Bertoldi, K., Cechinel, L.R., Schallenberger, B., Meireles, L., Basso, C., Lovatel, G. A., Bernardi, L., Lamers, M.L., Siqueira, I.R. (2017) Aging process alters hippocampal and cortical secretase activities of Wistar rats, *Behavioural Brain Research*, 317, pp. 374–381.

Betteridge, D.J. (2000) What is oxidative stress?, *Metabolism: clinical and experimental*, 49, pp. 3–8.

Bimonte, H.A., Nelson, M.E., Granholm, A.C.E. (2003) Age-related deficits as working memory load increases: Relationships with growth factors, *Neurobiology of Aging*, 24, pp. 37–48.

Bo, H., Jiang, N., Ji, L.L., Zhang, Y. (2013) Mitochondrial redox metabolism in aging: Effect of exercise interventions, *Journal of Sport and Health Science*, 2, pp. 67–74.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,

*Analytical Biochemistry*, 72, pp. 258-254.

Braith, R.W., Stewart, K.J. Resistance Exercise Training Its Role in the Prevention of Cardiovascular Disease, *Circulation*, 113:2642-2650.

Brooke, M., Kaiser, K. (1970) Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence, *The Journal of Histochemistry and Citochemistry: Official Journal of Histochemistry Society*, 18, pp. 670–672.

Capel, F., Demaison, L., Maskouri, F., Diot, A., Buffiere, C., Mirand, P.P., Mosoni, L. (2005) Calcium overload increases oxidative stress in old rat gastrocnemius muscle, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56, pp. 369–380.

Carageorgiou, H., Sideris, A.C., Messari, I., Liakou, C.I., Tsakiris, S. (2008) The effects of rivastigmine plus selegiline on brain acetylcholinesterase, (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-, Mg<sup>2+</sup>- ATPase activities, antioxidant status, and learning performance of aged rats, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4, pp. 687–699.

Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., Torres-Aleman, I. (2000) Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20, pp. 2926–2933.

Cechetti, F., Worm, P.V., Elsner, V.R., Bertoldi, K., Sanches, E., Ben, J., Siqueira, I.R., Netto, C.A. (2012) Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat, *Neurobiology of Learning and Memory*, 97, pp. 90–96.

Coelho, F., Gobbi, S., Andreatto, C., Corazza, D., Pedroso, R., Santos-Galduro, R. (2013) Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): A systematic review of experimental

studies in the elderly, *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 56, pp. 10–15.

Costa, M.S., Ardais, A.P., Fioreze, G.T., Mioranza, S., Botton, P.H.S., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., Porciúncula, L.O. (2012) The impact of the frequency of moderate exercise on memory and brain-derived neurotrophic factor signaling in young adult and middle-aged rats, *Neuroscience*, 222, pp. 100–109.

Cotman, C., Engesser-Cesar, C. (2002) Exercise enhances and protects brain function, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 30, pp. 75–79.

Cotman, C.W., Berchtold, N.C. (2002) Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity, *Trends in Neurosciences*, 25, pp. 295–301.

Cotman, C.W., Berchtold, N.C., Christie, L.A. (2007) Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation, *Trends in Neurosciences*, 30, pp. 464–472.

Curtis, R., Adryan, K.M., Stark, J.L., Park, J.S., Compton, D.L., Weskamp, G., Huber, L.J., Chao, M.V, Jaenisch, R., Lee, K.F., et al. (1995) Differential role of the low affinity neurotrophin receptor (p75) in retrograde axonal transport of the neurotrophins, *Neuron*, 14, pp. 1201–1211.

Davies, K., Quintanilha, A., Brooks, G., Packer, L. (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107, pp. 1198–1205.

Depp, C., Jeste, D.V (2006) Definitions and predictors of successful aging: a comprehensive review of larger quantitative studies, *The American journal of geriatric psychiatry: official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*. American Association for Geriatric Psychiatry, 14, pp. 6–20.

Dilger, R., Johnson, R. (2008) Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system, *Journal of leukocyte biology*, 84, pp. 932–939.

Ding, Q., Vaynman, S., Akhavan, M., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F. (2006) Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function, *Neuroscience*, 140, pp. 823–833.

Dishman, R., Berthoud, H., Booth, F., Cotman, C., Edgerton, V., Fleshner, M., Gandeia, S., Gomez-Pinilla, F., Greenwood, B., Hillman, C., et al. (2006) Neurobiology of Exercise, *Journal of Obesity*, 14, pp. 345–356.

Doherty, T. J. (2003) Invited review: Aging and sarcopenia, *Journal of applied physiology. American Physiological Society*, 95, pp. 1717–27.

Drummond, M.J., Vehrs, P.R., Schaalje, G.B., Parcell, A.C. (2005) Aerobic and resistance exercise sequence affects excess postexercise oxygen consumption, *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*, 19, pp. 332–7.

Duman, R.S. (2005) Neurotrophic factors and regulation of mood: Role of exercise, diet and metabolism, in *Neurobiology of Aging*, 26, pp. 88-93.

Gomes, E.C., Silva, A.N., de Oliveira, M.R. (2012) Oxidants, Antioxidants, and the Beneficial Roles of Exercise-Induced Production of Reactive Species, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, pp. 1–12.

Erickson, K. I., Prakash, R.S., Voss, M.W., Chaddock, L., Hu, L., Morris, K.S., White, S.M., Wójcicki, T.R., McAuley, E., Kramer, A.F. (2009) Aerobic fitness is associated with hippocampal volume in elderly humans, *Hippocampus*, 19, pp. 1030–1039.

Espinet, C., Gonzalo, H., Fleitas, C., Menal, M., Egea, J. (2015) Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Neurotrophic Approach, *Current Drug Targets*, 16, pp. 20–30.

Evans, M., Anderson, R.A., Graham, J., Ellis, G., Morris, K., Davies, S.,

Jackson, S., Lewis, M., Frenneaux, M., Rees, A. (2000) Ciprofibrate Therapy Improves Endothelial Function and Reduces Postprandial Lipemia and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus, *Circulation*, 101, pp. 1773–1779.

Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C. J., Palmer, T.D. (2003) VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis, *European Journal of Neuroscience*, 18, pp. 2803–2812.

Fadda, F., Cocco, S., Stancampiano, R. (2000) Hippocampal acetylcholine release correlates with spatial learning performance in freely moving rats, *Neuroreport*, 11, pp. 2265–9.

Farooqui, T., Farooqui, A.A. (2009) Aging: An important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Mechanisms of Ageing and Development*, 130, pp. 203–215.

Fischer, W., Sirevaag, A., Wiegand, S.J., Lindsay, R.M., Björklund, A. (1994) Reversal of spatial memory impairments in aged rats by nerve growth factor and neurotrophins 3 and 4/5 but not by brain-derived neurotrophic factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, pp. 8607–11.

Flôres, M.F., Martins, A., Schimidt, H.L., Santos, F.W., Izquierdo, I., Mello-Carpes, P.B., Carpes, F.P. (2014) Effects of green tea and physical exercise on memory impairments associated with aging, *Neurochemistry International*, 78, pp. 53–60.

Floyd, R.A., Hensley, K. (2002) Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases, *Neurobiology of Aging*, 23, pp. 795–807.

Fraser, C.L., Arieff, A.I., Cosmo, L. (2001) Na-K-ATPase activity decreases with aging in female rat brain synaptosomes, *American journal of physiology*.

*Regulatory, integrative and comparative physiology*, 281, pp. 674–678.

Frontera, W.R., Suh, D., Krivickas, L.S., Hughes, V., Goldstein, R., Roubenoff, R. (2000) Skeletal muscle fiber quality in older men and women, *American journal of physiology. Cell physiology*, 279, pp. C611–C618.

Fukui, K., Omoi, N., Hayasaka, T., Shinnkai, T., Suzuki, S., Abe, K., Urano, S. (2002) Cognitive Impairment of Rats Caused by Oxidative Stress and Aging , and Its Prevention by Vitamin E, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, pp. 275–284.

Fukui, K., Onodera, K., Shinkai, T., Suzuki, S., Urano, S. (2001) Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, pp. 168–75.

Gibson, G.E., Peterson, C. (1981) Aging Decreases Oxidative Metabolism and the Release and Synthesis of Acetylcholine, *Journal of Neurochemistry*, 37, pp. 978–984.

Günduz, F., Senturk, U., Kuru, O. (2004) The effect of one year swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats, *Physiological research*, 53, pp. 171–176.

Guo, Z.H., Mattson, M.P. (2000) Neurotrophic factors protect cortical synaptic terminals against amyloid and oxidative stress-induced impairment of glucose transport, glutamate transport and mitochondrial function, *Cerebral cortex*, 10, pp. 50–7.

Haider, S., Saleem, S., Perveen, T., Tabassum, S., Batool, Z., Sadir, S., Liaquat, L., Madiha, S. (2014) Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system, *Age*, 36, pp. 1291–1302.

- Halliwell, B. (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease, *American Journal of Medicine*, pp. 14S–22S.
- Halliwell, B. (2012) Free radicals and antioxidants: updating a personal view, *Nutrition Reviews*, 70, pp. 257–265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, *Free Radical Biology and Medicine*, 10, pp. 449-450.
- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *Journal of Gerontology*, 11, pp. 298–300.
- Heo, S., Csaszar, E., Jung, G., Beuk, T., Höger, H., Lubec, G. (2012) Hippocampal levels and activity of the sodium/potassium transporting ATPase subunit alpha-3 (AT1A3) are paralleling memory training in the multiple T-Maze in the C57BL/6J mouse, *Neurochemistry International*, 61, pp. 702–712.
- Hollander, J., Bejma, J., Ookawara, T., Ohno, H., Ji, L. (2000) Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: Fiber-specific effect of age, *Mechanisms of Ageing and Development*, 116, pp. 33–45.
- Hölscher, C. (2003) Time, space and hippocampal functions, *Reviews in the neurosciences*, 14, pp. 253–84.
- Hosseini-Sharifabad, A., Mohammadi-Eraghi, S., Tabrizian, K., Soodi, M., Khorshidahmad, T., Naghdi, N., Abdollahi, M., Beyer, C., Roghani, A., Sharifzadeh, M. (2011) Effects of training in the Morris water maze on the spatial learning acquisition and VAcHT expression in male rats, *DARU*, 19, pp. 166–172.
- Hung, C.W., Chen, Y.C., Hsieh, W.L., Chiou, S.H., Kao, C.L. (2010) Ageing and neurodegenerative diseases, *Ageing Research Reviews*, 9S, pp. S36–S46.
- Hunter, G.R., McCarthy, J.P., Bamman, M.M. (2004) Effects of resistance

training on older adults, *Sports Medicine*, 34, pp. 329–348.

IBGE. Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade - 1980-2050. 2008; 24:1-94.

Jackson, M.J. (2011) Control of Reactive Oxygen Species Production in Contracting Skeletal Muscle, *Antioxidants & Redox Signaling*, 15, pp. 2477–2486.

Jenkins, R.R. (1993) Exercise, oxidative stress, and antioxidants: a review, *Int Journal of Sport Nutrition*, 3, pp. 356–75.

Ji, L. (1993) Antioxidant enzyme response to exercise and aging, *Medicine and Science in Sports and Exercise*, pp. 225–231.

Ji, L. (2008) Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: Role of redox signaling, *Free Radical Biology and Medicine*, 44, pp. 142–152.

Jolitha, A.B., Subramanyam, M.V.V., Asha Devi, S. (2009) Age-related responses of the rat cerebral cortex: Influence of vitamin E and exercise on the cholinergic system, *Biogerontology*, 10, pp. 53–63.

Jurgens, H.A., Johnson, R.W. (2012) Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation, *Experimental Neurology*, 233, pp. 40–48.

Kaisho, Y., Ohta, H., Miyamoto, M., Igarashi, K. (1999) Nerve growth factor promoter driven neurotrophin-3 overexpression in the mouse and the protective effect of transgene on age-related behavioral deficits, *Neuroscience Letters*, 277, pp. 181–184.

Kim, S.E., Ko, I.G., Kim, B.K., Shin, M.S., Cho, S., Kim, C.J., Kim, S.H., Baek, S.S., Lee, E.K., Jee Yong-Seok, Y.S. (2010) Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus, *Experimental Gerontology*, 45,



pp. 357–365.

Klumpp, S., Kriha, D., Bechmann, G., Maaßen, A., Maier, S., Pallast, S., Hoell, P., Josef, K. (2006) Phosphorylation of the growth factors bFGF, NGF and BDNF: A prerequisite for their biological activity, *Neurochemistry International*, 48, pp. 131–137.

Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H., Bonhoeffer, T. (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, pp. 8856–60.

Kramer, A.F., Erickson, K.I. (2007) Capitalizing on cortical plasticity: influence of physical activity on cognition and brain function, *Trends in Cognitive Sciences*, 11, pp. 342–348.

Kuipers, S., Bramham, C.R. (2006) Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 9, pp. 580–586.

Kukolja, J., Thiel, C.M., Wilms, M., Mirzazade, S., Fink, G.R. (2009) Ageing-related changes of neural activity associated with spatial contextual memory, *Neurobiology of Aging*, 30, pp. 630–645.

Lambertucci, R.H., Levada-Pires, A.C., Rossoni, L.V., Curi, R., Pithon-Curi, T.C. (2007) Effects of aerobic exercise training on antioxidant enzyme activities and mRNA levels in soleus muscle from young and aged rats, *Mechanisms of Ageing and Development*, 128, pp. 267–275.

Larsen, J.O., Skalicky, M., Viidik, A. (2000) Does long-term physical exercise counteract age-related Purkinje cell loss? A stereological study of rat cerebellum, *Journal of Comparative Neurology*, 428, pp. 213–222.

- LeBel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C. (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chemical research in toxicology*, 5, pp. 227–231.
- Lee, C.H., Hwang, I.K., Choi, J.H., Yoo, K.Y., Park, O.K., Huh, S.O., Lee, Y.L., Shin, H.C., Won, M.H. (2010) Age-dependent changes in calretinin immunoreactivity and its protein level in the gerbil hippocampus, *Neurochemical Research*, 35, pp. 122–129.
- Leeds, P., Leng, Y., Chalecka-Franaszek, E. and Chuang, D.M. (2005) Neurotrophins protect against cytosine arabinoside-induced apoptosis of immature rat cerebellar neurons, *Neurochemistry International*, 46, pp. 61–72.
- Liochev, S. (2013) Reactive oxygen species and the free radical theory of aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 60, pp. 1–4.
- Lopez-Lopez, C., LeRoith, D., Torres-Aleman, I. (2004) Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, pp. 9833–9838.
- Lovatel, G.A., Elsner, V.R., Bertoldi, K., Vanzella, C., Moysés, F. dos S., Vizuite, A., Spindler, C., Cechinel, L.R., Netto, C.A., Muotri, A.R., et al. (2013) Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, Neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus, *Neurobiology of Learning and Memory*, 101, pp. 94–102.
- Lu, B., Chow, A. (1999) Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity', *Journal of Neuroscience Research*, 58, pp. 76–87.
- Macaluso, A., De Vito, G. (2004) Muscle strength, power and adaptations to resistance training in older people, *European Journal of Applied Physiology*, pp. 450–472.

Marklund, S.L. (1985) Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice, *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 148, pp. 129–134.

Martin, I., Grotewiel, M.S. (2006) Oxidative damage and age-related functional declines, 127, pp. 411–423.

McArdle, A., Dillmann, W.H., Mestril, R., Faulkner, J.A., Jackson, M.J. (2004) Overexpression of HSP70 in mouse skeletal muscle protects against muscle damage and age-related muscle dysfunction, *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18, pp. 355–357.

Meneses, A. (1999) 5-HT system and cognition, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, pp. 1111–1125.

Menshikova, E.V, Ritov, V.B., Ferrell, R.E., Azuma, K., Goodpaster, B.H., Kelley, D.E. (2007) Characteristics of skeletal muscle mitochondrial biogenesis induced by moderate-intensity exercise and weight loss in obesity, *Journal of applied physiology*, 103, pp. 21–27.

Migliore, L., Coppedè, F. (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674, pp. 73–84.

Mitchell, W.K., Williams, J., Atherton, P., Larvin, M., Lund, J., Narici, M. (2012) Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review, *Frontiers in Physiology*, 3, pp. 1–18.

Moffat, S.D., Elkins, W., Resnick, S.M. (2006) Age differences in the neural systems supporting human allocentric spatial navigation, *Neurobiology of Aging*,

27, pp. 965–972.

Moraska, A., Deak, T., Spencer, R.L., Roth, D., Fleshner, M. (2000) Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 279, pp. R1321-R1329.

Morth, J., Pedersen, B., Buch-Pedersen, M., Andersen, J., Vilsen, B., Palmgren, M., Nissen, P. (2011) A structural overview of the plasma membrane Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-ATPase ion pumps, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, pp. 60–70.

Moseley, A.E., Williams, M.T., Schaefer, T.L., Bohanan, C.S., Neumann, J.C., Behbehani, M.M., Vorhees, C.V., Lingrel, J.B. (2007) Deficiency in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase alpha Isoform Genes Alters Spatial Learning, Motor Activity, and Anxiety in Mice, *The Journal of Neuroscience*, 27, pp. 616–626.

Mulero, J., Zafrilla, P., Martinez-Cacha, A. (2011) Oxidative stress, frailty and cognitive decline, *The Journal of nutrition, Health & Aging*, 15, pp. 756-760.

Nakata, H., Nakamura, S. (2007) Brain-derived neurotrophic factor regulates AMPA receptor trafficking to post-synaptic densities via IP3R and TRPC calcium signaling, *FEBS Letters*, 581, pp. 2047–2054.

Narath, E., Skalicky, M., Viidik, A. (2001) Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently, *Experimental Gerontology*, 36, pp. 1699–1711.

Neeper, S., Gómez-Pinilla, F., Choic, J., Cotman, C. (1996) Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain, *Brain Research*, 726, pp. 49–56.

O'Callaghan, R.M., Ohle, R., Kelly, A.M. (2007) The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-

- spatial learning, *Behavioural Brain Research*, 176, pp. 362–366.
- O'Keefe, J., Nadel, L. (1979) The hippocampus as a cognitive map, *Behavioral and Brain Sciences*, 2, pp. 487–494.
- Oh-Ishi, S., Takako, K., Hitoshi, Y., Naokazu, N., Keiichiro, S., Naoyuki, T., Hideki, O. (1995) Alterations of Superoxide Dismutase Iso-Enzyme Activity, Content, and mRNA Expression With Aging in Rat Skeletal Muscle, *Mechanisms of Ageing and Development*, 84, pp. 65–76.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95, pp. 351–358.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4, pp. 552–565.
- Papandreou, M. A., Tsachaki, M., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P., Lamari, F. N., Margaritis, M. (2011) Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection, *Behavioural Brain Research*, 219, pp. 197–204.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V., Ruggiero, F.M. (2011) Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin, *Neurochemistry International*, 58, pp. 447–457.
- Peters, R. (2006) Ageing and the brain, *Postgraduate medical journal*, 82, pp. 84–8.
- Pietá Dias, C., Martins de Lima, M.N., Presti-Torres, J., Dornelles, A., Garcia, V. A., Siciliani Scalco, F., Rewsaat Guimarães, M., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., Schröder, N. (2007) Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats, *Neuroscience*, 146, pp. 1719–1725.
- Pilegaard, H., Ordway, G., Saltin, B., Neufer, P. (2000) Transcriptional

regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 279, pp. E806–E814.

Pingitore, A., Lima, G.P.P., Mastorci, F., Quinones, A., Iervasi, G., Vassalle, C. (2015) Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports, *Nutrition*, 31, pp. 916–922.

Pinho, R., Andrades, M., Oliveira, M., Pirola, A., Zago, M., Silveira, P., Dal-Pizzol, F., Moreira, J. (2006) Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise, *Cell Biology International*, 30, pp. 848–853.

Porter, M., Vandervoort, A. and Lexell, J. (1995) Aging of human muscle: structure, function and adaptability, *Scandinavian Journal of Medicine and Science*, 5, pp. 129–142.

Powers, S., Jackson, M. (2008) Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production, *Physiological reviews*, 88, pp. 1243–1276.

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, *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 266, pp. R375–R380.

Pringle, A.K., Sundstrom, L.E., Wilde, G.J.C., 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, *Neuroscience Letters*, 211, pp. 203–206.

Van Praag, H. (2009) Exercise and the brain: something to chew on, *Trends in Neuroscience*, 32, pp. 283–290.

Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., Gage, F.H. (2005) Exercise Enhances Learning and Hippocampal Neurogenesis in Aged Mice, *Journal of Neuroscience*, 25, pp. 8680–8685.

Radák, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucso, J., Sasvári, M., Nyakas, C., Goto, S. (2001) Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain, *Neurochemistry international*, 38, pp. 17–23.

Radák, Z., Pucso, J., Mecseki, S., Csont, T., Ferdinandy, P. (1999) Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, pp. 1059–1063.

Radak, 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, *Neurochemistry International*, 49, pp. 387–392.

Ragozzino, M.E., Unick, K.E., Goldt, P.E., Mcgaugh, J.L. (1996) Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: Augmentation by glucose, *Psychology*, 93, pp. 4693–4698.

Rasmussen, P., Brassard, P., Adser, H., Pedersen, M.V., Leick, L., Hart, E., Secher, N.H., Pedersen, B.K., Pilegaard, H. (2009) Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise, *Experimental physiology*, 94, pp. 1062–1069.

Raz, N., Lindenberger, U., Rodrigue, K.M., Kennedy, K.M., Head, D., Williamson, A., Dahle, C., Gerstorf, D., Acker, J.D. (2005) Regional brain changes in aging healthy adults: General trends, individual differences and modifiers, *Cerebral Cortex*, 15, pp. 1676–1689.

Reichardt, L.F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways, *Philosophical Transactional of the Royal Society*, 361, pp. 1545–1564.

Reid, K.J., Baron, K.G., Lu, B., Naylor, E., Wolfe, L., Zee, P.C. Aerobic exercise improves self-reported sleep and quality of life in older adults with insomnia, *Sleep Medicine*, 11, pp. 934-940.

dos Reis-Lunardelli, E., Castro, C., Bavaresco, C., Coitinho, A., da Trindade, L., Perrenoud, M., Roesler R,S.J., de Souza Wyse, A., Izquierdo, I. (2007) Effects of thyroid hormones on memory and on Na(+), K(+)-ATPase activity in rat brain, *Current neurovascular research*, 4, pp. 184–193.

dos Reis, E.A., De Oliveira, L.S., Lamers, M.L., Netto, C.A., Wyse, A.T.S. (2002) Arginine administration inhibits hippocampal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats, *Brain Research*, 951, pp. 151–157.

Reznick, A., Witt, E., Matsumoto, M., Packer, L. (1992) Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189, pp. 801–806.

Rosenzweig, E.S., Barnes, C.A. (2003) Impact of aging on hippocampal function: Plasticity, network dynamics, and cognition, *Progress in Neurobiology*, pp. 143–179.

Russell, J.C., Epling, W.F., Pierce, D., Amy, R.M. (1987) Induction of voluntary prolonged running by rats, *Journal of Applied Physiology*, 63, pp. 2549–2553.

Russo-Neustadt, A., Chen, M. (2005) Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity, *Current Pharmaceutical Design*, 11, pp. 1495–1510.

Salehi, A., Delcroix, J.D., Mobley, W.C. (2003) Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration, *Trends in Neurosciences*, 26, pp. 73–80.



- Salehi, A., Delcroix, J.D., Swaab, D.F. (2004) Alzheimer's disease and NGF signaling, *Journal of Neural Transmission*, 111, pp. 323–345.
- Sampedro-Piquero, P., Zancada-Menendez, C., Begega, A., Mendez, M. and Arias, J.L. (2013) Effects of forced exercise on spatial memory and cytochrome c oxidase activity in aged rats, *Brain Research*, 1502, pp. 20–29.
- Sanz, N., Díez-Fernández, C., Alvarez, A., Cascales, M. (1997) Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems, *Journal of Hepatology*, 27, pp. 525–534.
- Savitha, S., Tamilselvan, J., Anusuyadevi, M., Panneerselvam, C. (2005) Oxidative stress on mitochondrial antioxidant defense system in the aging process: Role of DL- $\alpha$ -lipoic acid and L-carnitine, *Clinica Chimica Acta*, 355, pp. 173–180.
- Scarmeas, N., Luchsinger, J.A., Brickman, A.M., Cosentino, S., Tang, M.X., Stern, Y. (2009) Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease, *JAMA*, 302, pp. 627–637.
- Schiaffino, S., Reggiani, C. (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles, *Physiological reviews*, 91, pp. 1447–531.
- Schliebs, R., Arendt, T. (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration, *Behavioural Brain Research*, 221, pp. 555-563.
- 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 Research Bulletin*, 71, pp. 155–159.
- Sengupta, P. (2013) The laboratory rat: Relating its age with human's, *International Journal of Preventive Medicine*, pp. 624–630.
- Serrano, F., Klann, E. (2004) Reactive oxygen species and synaptic plasticity in

the aging hippocampus, *Ageing Research Reviews*, 3, pp. 431-443.

Siqueira, I. R., Fochesatto, C., De Andrade, A., Santos, M., Hagen, M., Bello-Klein, A., Netto, C.A. (2005) Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain, *International Journal of Developmental Neuroscience*, 23, pp. 663–671.

Socci, D.J., Sanberg, P.R., Arendash, G.W. (1995) Nicotine Enhances Morris Water Maze Performance of Young and Aged Rats, *Neurobiology of Aging*, 16, pp. 857–860.

Stadtman, E., Levine, R. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids*, 25, pp. 207–218.

Stancampiano, R., Cocco, S., Cugusi, C., Sarais, L., Fadda, F. (1999) Serotonin and acetylcholine release response in the rat hippocampus during a spatial memory task, *Neuroscience*, 89, pp. 1135–1143.

Szczesny, B., Tann, A., Mitra, S. (2010) Age- and tissue-specific changes in mitochondrial and nuclear DNA base excision repair activity in mice: susceptibility of skeletal muscles to oxidative injury, *Mechanisms of Ageing and Development*, 144, pp. 724–732.

Szuhany, K., Bugatti, M., Otto, M., (2015) A meta-analytic review of the effects of exercise on brain- derived neurotrophic factor, *Journal of Psychiatric Research*, 60, pp. 56–64.

Szulc, P., Beck, T.J., Delmas, P.D. (2005) Low Skeletal Muscle Mass Is Associated With Poor Structural Parameters of Bone and Impaired Balance in Elderly Men, *Journal of Bone and Mineral Research*, 20, pp. 721-729.

Taridi, N.M., Rani, N.A., Latiff, A.A., Ngah, W.Z.W., Mazlan, M. (2014) Tocotrienol Rich Fraction Reverses Age-Related Deficits in Spatial Learning and Memory in Aged Rats, *Lipids*, 49, pp. 855–869.

Tiana, L., Caib, Q., Wei, H. (1998) Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging, *Free Radical Biology and Medicine*, 24, pp. 1477–1484.

Trejo, J.L., Carro, E., Torres-Alemá, I. (2001) Circulating Insulin-Like Growth Factor I Mediates Exercise-Induced Increases in the Number of New Neurons in the Adult Hippocampus, *The Journal of Neuroscience*, 21, pp. 1628–1634.

Tromm, C.B., Pozzi, B.G., Paganini, C.S., Marques, S.O., Pedroso, G.S., Souza, P.S., Silveira, P.C.L., Silva, L.A., De Souza, C.T., Pinho, R.A. (2016) The role of continuous versus fractionated physical training on muscle oxidative stress parameters and calcium-handling proteins in aged rats, *Aging Clinical and Experimental Research*, 28, pp. 833–841.

Vannucchi, H., Moreira, E.A.M., Cunha, D.F., Junqueira-Franco, M.V.M., Bernardes, M.M., Jordão-Jr, A.A. (1998) Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante, *Medicina*, 31, pp. 31–44.

Vasilaki, A., Mansouri, A., Van Remmen, H., van der Meulen, J., Larkin, L., Richardson, A., McArdle, A., Faulkner, J., Jackson, M., Kizaki, T., et al. (2006) Alterations of superoxide dismutase iso-enzyme activity, content, and mRNA expression with aging in rat skeletal muscle, *Aging Cell*, 5, pp. 109–117.

Vassalle, C., Pingitore, A., De Giuseppe, R., Vigna, L.B.F. (2015) Biomarkers to estimate bioefficacy of dietary/supplemental antioxidants in sports, *Antioxidants in sport nutrition*, pp. 255–272.

Villanueva, R. (2013) Neurobiology of Major Depressive Disorder, *Neural Plasticity*, 2013, pp. 1-7.

Wendel, A. (1981) *Glutathione peroxidase*, *Methods in Enzymology*, 77, pp. 325-333.

Weuve, J., Kang, J.H., Manson, J.E., Breteler, M.M.B., Ware, J.H. and

Grodstein, F. (2004) Physical activity, including walking, and cognitive function in older women, *JAMA*, 292, pp. 1454–1461.

Witt, E.H., Reznick, Z., Viguie, C., Starke-Reed, P., Packer, L. (1992) Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation, *The Journal of nutrition*, 122, pp. 766–773.

Wyse, A.T.S., Bavaresco, C.S., Reis, E.A., Zugno, A.I., Tagliari, B., Calcagnotto, T., Netto, C.A. (2004) Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus, *Physiology & Behavior*, 80, pp. 475–479.

Van der Zee, E.A., Compaan, J.C., Bohus, B., Luiten, P.G.M. (1995) Alterations in the immunoreactivity for muscarinic acetylcholine receptors and colocalized PKC in mouse hippocampus induced by spatial discrimination learning, *Hippocampus*, 5, pp. 349–362.

Zhang, Q., Wu, Y., Zhang, P., Sha, H., Jia, J., Hu, Y., Zhu, J. (2012) Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats, *Neuroscience*, 205, pp. 10–17.