

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
ESCOLA SUPERIOR DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA



Dissertação

**Efeitos de diferentes modelos de exercícios físicos em parâmetros
cerebrais em camundongos saudáveis**

Natan Feter

Pelotas/RS, 2018

NATAN FETER

**Efeitos de diferentes modelos de exercícios físicos em parâmetros
cerebrais de camundongos saudáveis**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Educação Física (área do conhecimento: Biodinâmica do Movimento Humano). Linha de pesquisa: Epidemiologia da Atividade Física).

Orientador: Prof. Dr. Airton José Rombaldi

Pelotas/RS, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F421e Feter, Natan

Efeitos de diferentes modelos de exercícios físicos em parâmetros cerebrais em camundongos saudáveis / Natan Feter ; Airton José Rombaldi, orientador. — Pelotas, 2018.
161 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Escola Superior de Educação Física, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Exercício. 2. Cérebro. 3. Memória. 4. Estresse oxidativo. I. Rombaldi, Airton José, orient. II. Título.

CDD : 796

Elaborada por Daiane de Almeida Schramm CRB: 10/1881

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Airton José Rombaldi
Escola Superior de Educação Física (UFPEL)

Prof. Dr. Gustavo Dias Ferreira
Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFPEL)

Prof. Dr. Jessié Martins Gutierres
Universidade Federal de Ciências de Saúde de Porto Alegre

**Dedico esse trabalho a meus
pais, irmãos, noiva e avós (*in
memoriam*)**

Agradecimentos

A D'us, pela força, paciência, esperança e nunca me deixar só.

Aos meus pais, por tudo que fizeram e fazem para que eu nunca desista dos meus sonhos e objetivos. Pelos ensinamentos, carinho e eterna motivação.

As minhas irmãs e irmão, por sempre estarem comigo. Companheiros de vida e estudo.

A minha amiga, companheira, e parceira de vida. Por estar comigo em todos os momentos. Por nunca me deixar desistir. Pelos lanches no meio da noite, pelo carinho quando estava cansado, pelo ombro quando só queria um lugar seguro para desabafar.

Aos meus avós (*in memoriam*). Pelos ensinamentos, palavras e sobre tudo amizade. A saudade é eterna.

Ao meu orientador, por todo o aprendizado e, principalmente, confiança. Por estar ao meu lado sempre que precisei.

Aos auxiliares voluntários que me ajudaram a conduzir a intervenção. Jayne, Miguel, Graciela, Paula, Matheus, Guilherme, Maicon, Gabriele e Ricardo. Sem vocês, nada seria possível.

Aos funcionários do Biotério Central da UFPel pelo incansável suporte inclusive nos finais de semana.

Ao Matheus pelo apoio e aprendizado desde a graduação até a idealização do estudo.

As Professoras Francieli Moro Stefanello e Roselia Maria Spanevelløe, pelo apoio desde a idealização do estudo até o término do mesmo.

As alunas de mestrado e doutorado orientandas das Professoras Rosélia e Francieli. Pela realização dos testes comportamentais e coleta de tecidos e sangue, e por serem solícitas em qualquer momento.

A Prof. Dr. Anelise Campello Felix, pela disponibilidade na realização das eutanásias e principalmente por confiar no meu trabalho e profissionalismo.

Ao Guilherme, pelo apoio e parceria em desenvolver o sistema de roda livre com contagem de voltas.

Aos meu amigos e companheiros de dia-a-dia. Por me escutar quanto precisava só desabafar, pela compreensão quando tinha que ficar sentado escrevendo sem poder lhes dar atenção.

Enfim, novamente a D'us, por ter colocado em minha vida essas pessoas. Minha gratidão a todos vocês.

***“O que passou, passou, mas o que passou luzindo,
resplandecerá para sempre.”
(Johann Goethe)***

Resumo

FETER, Natan. **Efeitos de diferentes modelos de exercícios físicos em parâmetros cerebrais de camundongos saudáveis**. 2018. 162f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Educação Física. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Objetivo: O presente estudo investigou os efeitos crônicos de diferentes modelos de exercício físico e atividade física na função cognitiva, atividade colinérgica e marcadores de estresse oxidativo no córtex cerebral e hipocampo.

Metodologia: Oitenta camundongos C57BL / 6 de 60 dias foram divididos em cinco grupos: sedentário (SED), treinamento contínuo de intensidade moderada (MICT), treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT), treinamento resistido (RT) e atividade física (RW). Função cognitiva (memória de curto prazo e memória espacial), parâmetros de estresse oxidativo e atividade da acetilcolinesterase (AChE) no córtex cerebral e no hipocampo foram determinados.

Resultados: Camundongos MICT exibiram memória de reconhecimento melhorada em comparação com camundongos SED ($p = 0,046$) e outros grupos exercitados (HIIT: $p < 0,001$; RW: $p = 0,003$; RT: $p < 0,001$). RT apresentou melhor memória espacial em relação a SED ($p = 0,004$), MICT ($p = 0,019$) e RW ($p = 0,003$). Os modelos de treinamento RW, MICT, HIIT e RT reduziram o nitrito em comparação com SED. A RT produziu aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica ($p = 0,01$) e espécies reativas de oxigênio (ROS) ($p < 0,001$) em comparação com a SED. MICT promoveu um aumento na atividade da catalase (CAT) ($p = 0,002$) enquanto a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi diminuída em TR em comparação com MICT e HIIT ($p = 0,008$). No córtex cerebral, RT aumentou o nível de ROS, mas exibiu o menor nível de peroxidação lipídica entre os grupos ($p < 0,001$). RW apresentou um aumento da atividade induzida pela peroxidação lipídica em comparação com SED e o maior nível de atividade da CAT entre todos os grupos ($p < 0,001$). A atividade da AChE foi maior em RT em comparação com SED, MICT e RW ($p = 0,039$) no córtex cerebral.

Conclusão: O nível de nitrito foi diminuído em grupos de intervenção independentemente da atividade ou modelo de exercício. Da mesma forma, MICT melhorou a memória de reconhecimento, além de aumentar a atividade da CAT. Embora RT mostrasse níveis elevados de ROS e peroxidação lipídica no hipocampo, o modelo poderia melhorar a memória espacial.

Palavras-chave: exercício; cérebro; memória; estresse oxidativo.

Abstract

FETER, Natan. **Effects of different models of physical exercise on brain parameters in healthy mice**. 2018. 162f. Dissertation (Master's Degree) - Post-Graduation Program in Physical Education. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Purpose: The present study investigated the chronic effects of different physical exercise and physical activity models on cognitive function, cholinergic activity, and oxidative stress markers in the cerebral cortex and hippocampus.

Methods: Eighty 60-day C57BL/6 mice were divided into five groups: sedentary (SED), moderate-intensity continuous training (MICT), high-intensity interval training (HIIT), resistance training (RT), and physical activity (RW). Cognitive function (short-term memory and spatial memory), oxidative stress parameters, and acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex and hippocampus were evaluated. **Results:** MICT mice exhibited an enhanced recognition memory compared to SED mice ($p=0.046$) and other exercised groups (HIIT: $p<0.001$; RW: $p=0.003$; RT: $p<0.001$). RT group showed better spatial memory compared to SED ($p=0.004$), MICT ($p=0.019$) and RW ($p=0.003$) groups. RW, MICT, HIIT, and RT training models reduced nitrite compared to SED. RT lead to a significant increase in both lipid peroxidation ($p=0.01$) and reactive oxygen species (ROS) ($p<0.001$) levels compared to SED. MICT promoted an increasing in catalase (CAT) activity ($p=0.002$) while superoxide dismutase (SOD) activity was diminished at RT comparing to MICT and HIIT ($p=0.008$). In cerebral cortex, RT increased ROS level, but it exhibited the lowest lipid peroxidation level among groups ($p<0.001$). RW presented an activity-induced increasing in lipid peroxidation level compared to SED and the highest level of CAT activity among all groups ($p<0.001$). AChE activity was higher in RT compared to SED, MICT and RW groups ($p=0.039$) in cerebral cortex.

Conclusion: In summary, we showed that nitrite level was decreased in intervention groups regardless activity or exercise model. Likewise, MICT improved recognition memory besides increased CAT activity. Although RT showed elevated ROS and lipid peroxidation level at hippocampus, this model could enhance spatial memory.

Keywords: exercise; brain; memory; oxidative stress.

Sumário

1. Projeto de Pesquisa	10
2. Relatório de trabalho de campo	108
3. Artigo	112
4. Comunicado a imprensa	144
5. Anexo	146

1. Projeto de Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
ESCOLA SUPERIOR DE EDUCAÇÃO FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA
CURSO DE MESTRADO DE EDUCAÇÃO FÍSICA



Projeto de Dissertação

**Efeitos de diferentes modelos de exercícios físicos em parâmetros
cerebrais em camundongos saudáveis**

Natan Feter

Pelotas/RS, 2017

NATAN FETER

**Efeitos de diferentes modelos de exercícios físicos em parâmetros
cerebrais de camundongos saudáveis**

Projeto de pesquisa apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Educação
Física da Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Educação Física (linha de
pesquisa: Epidemiologia da Atividade Física).

Orientador: Prof. Dr. Airton José Rombaldi
Coorientador: Prof. Ms. Matheus Pintanel Freitas

Pelotas/RS, 2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Airton José Rombaldi (orientador)

Prof. Dr. Gustavo Dias Ferreira

Prof. Dr. Jessié Martins Gutierrez

Resumo

Feter, Natan. Efeitos de diferentes modelos de exercícios físicos em parâmetros cerebrais em camundongos saudáveis. 2017. 92f. Projeto de Pesquisa (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Escola Superior de Educação Física, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

As doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, e desordens da saúde mental, como a depressão, afetam milhões de pessoas globalmente. Adicionalmente, o Alzheimer é a principal causa de demência no mundo, sendo responsável por até 70% dos casos. Na América Latina, o Brasil é o país com maior prevalência de demência, com aproximadamente 1,6 milhões de pessoas em 2015. A depressão afeta mundialmente mais de 300 milhões de pessoas, e no Brasil foi diagnosticada em cerca de 11,5 milhões de indivíduos, sendo o país com maior prevalência dessa desordem mental. A literatura reporta que a prática regular de exercício físico e atividade física auxiliam no combate e no tratamento desses processos neurodegenerativos. No entanto, há uma inconsistência nos resultados encontrados quando é avaliada a reposta de diferentes formas de exercício ou atividade física sobre determinados parâmetros ligados ao sistema nervoso central, como metabolismo e plasticidade cerebral. Desta forma, o estudo objetivará determinar os efeitos de seis semanas de treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada, treinamento intervalado de alta intensidade, corrida voluntária na gaiola, treinamento resistido e do sedentarismo sobre a concentração de fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), de diferentes enzimas oxidantes e antioxidantes, na modulação do sistema colinérgico e memória de curto e longo prazo em camundongos adultos saudáveis. Para tanto, será realizado um estudo experimental de caráter pré-clínico, com duração total de intervenção igual a seis semanas. Serão analisados os tecidos do córtex cerebral e hipocampo. A resposta dos modelos de sedentarismo, exercício físico e atividade física sobre o sistema colinérgico será medida através da mensuração das concentrações de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e Ca^+ATPase e da atividade da acetilcolinesterase. Em relação ao estresse oxidativo, serão coletadas as concentrações de catalase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase, espécies reativas de oxigênio e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Além disso, serão realizadas as seguintes medidas: o teste de reconhecimento de objetos será realizado para identificar o efeito da intervenção sobre a memória de curto e longo prazo; a concentração de BDNF será identificada a fim de verificar o efeito neuroprotetor das intervenções; através de teste progressivo de esforço máximo e do teste de campo aberto serão mensurados a aptidão cardiorrespiratória e a atividade locomotora e exploratória dos animais.

Abstract

Feter, Natan. Effects of different models of physical exercise on brain parameters in healthy mice. 2017. 92f. Dissertation (Master degree in Physical Education). Graduation Program in Physical Education, Superior School of Physical Education, Federal University of Pelotas, Pelotas.

Neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's, and mental health disorders, such as depression, affect millions of people globally. In addition, Alzheimer's is the leading cause of dementia in the world, accounting for up to 70% of cases. In Latin America, Brazil is the country with the highest prevalence of dementia, with approximately 1.6 million people in 2015. Depression affects more than 300 million people worldwide and in Brazil was diagnosed in about 11.5 million people, being the country with the highest prevalence of this mental disorder. The literature reports that regular practice of physical exercise and physical activity aid in the combat and treatment of these neurodegenerative processes. However, there is an inconsistency in the results found when evaluating the response of different forms of physical exercise or activity on certain parameters linked to the central nervous system, such as metabolism and brain plasticity. Thus, the study will aim to determine the effects of six weeks of moderate intensity continuous training, high intensity interval training, voluntary wheel running, resistance training and sedentary lifestyle on the concentration of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), different oxidative and antioxidants enzymes, in the modulation of the cholinergic system and short- and long-term memory in healthy adult mice. Therefore, an experimental study of pre-clinical trial, with a 6-weeks intervention. The tissues of the cerebral cortex and hippocampus will be analyzed. The responses of the sedentary, physical exercise and physical activity models on the cholinergic system will be assessed measuring Na⁺K⁺ATPase and Ca⁺ATPase concentrations. In relation to oxidative stress, the concentrations glutathione peroxidase, superoxide dismutase, reactive oxygen species, thiobarbituric acid reactive substances, and catalase activity will be collected. In addition, the following measures will be conducted: the object recognition test will be adopted to identify the effect of the intervention on short and long term memory. In addition; the concentration of BDNF will be identified in order to verify the neuroprotective effect of the interventions; through progressive maximal exercise test and open field test, the cardiorespiratory fitness and the locomotor and exploratory activity of the animals will be measured.

Lista de Quadros

Quadro 1	Protocolo das intervenções que serão realizadas.....	70
-----------------	--	----

Lista de Figuras

Figura 1	O Papiro de Edwin Smith, datado do século 17 A.C.....	26
Figura 2	Desenvolvimento do cérebro.....	29
Figura 3	Massa cinzenta e massa branca.....	30
Figura 4	Lobos cerebrais.....	31
Figura 5	A: Comparação do formato do hipocampo com um cavalo-marinho. B: Regiões do hipocampo: CA1, CA2, CA3 e DG (giro dentado).....	33
Figura 6	Representação esquemática do estresse oxidativo celular	35
Figura 7	Desenho esquemático da formação de espécies reativas nas células.....	36
Figura 8	Imagem ilustrativa da barreira hematoencefálica.....	40
Figura 9	Processo de síntese de acetilcolina na sinapse. Adaptado por Berne e colaboradores (2010).....	42
Figura 10	Declínio cognitivo relacionado à idade como resultado de mudanças neuroanatômicas impulsionadas pela diminuição do suprimento de energia.....	51
Figura 11	A ligação de glutamato ao seu receptor NMDA e as mudanças estruturais na espinha dendrítica induzidas por BDNF e TrkB. Adaptada de Matsumoto et al. (2008).....	53
Figura 12	Efeito do exercício sobre o aprendizado e a memória através da cascata de fatores de crescimento.....	65
Figura 13	Exemplo de caixa onde será realizado o teste de campo aberto.....	67
Figura 14	Exemplo da organização dos objetos (A) e cronograma (B) durante os de reconhecimento.....	75
Figura 15	Exemplo da organização dos objetos (A) e cronograma (B) durante os de reconhecimento.....	76

Lista de Abreviaturas e Siglas

AcetilCoA	Acetil Coenzima A
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterase
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT	Catalase
DA	Doença de Alzheimer
DND	Doenças neurodegenerativas
GLUT	Transportadores de glicose
GPX	Glutathione peroxidase
GSSG	Glutathione oxidada
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MCT	Transportador de ácido monocarboxílico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TACIM	Treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TIAI	Treinamento intervalado de alta intensidade
TR	Treinamento resistido
trkB	Receptor tirosina kinase B

Sumário

1. Introdução.....	21
1.1 Objetivos.....	23
1.2 Hipótese.....	23
1.3 Justificativa.....	24
2. Fundamentação teórica.....	25
2.1 Sistema nervoso: do Egito Antigo ao século XXI.....	25
2.2 Hipocampo.....	32
2.3 Estresse oxidativo.....	34
2.4 Metabolismo energético cerebral.....	36
2.5 Fator neurotrófico derivado do cérebro.....	47
2.6 Exercício físico e atividade física relacionados à saúde.....	48
2.7 Plasticidade neuronal e exercício físico.....	50
2.8 Exercício físico, atividade física e memória.....	64
3. Materiais e métodos.....	69
3.1 Delineamento.....	69
3.2 Animais.....	69
3.3 Randomização e protocolo de treinamento.....	69
3.4 Teste comportamental de campo aberto.....	74
3.5 Reconhecimento de objetos.....	75
3.6 Aptidão cardiorrespiratória.....	77
3.7 Amostras biológicas.....	77
3.8 Preparação do tecido cerebral.....	77
3.9 Medida da concentração de BDNF livre total.....	78
3.10 Medida da atividade da AChE.....	78
3.11 Medida da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase.....	79
3.12 Medida da atividade da Ca²⁺-ATPase.....	79
3.13 Determinação de parâmetros do estresse oxidativo.....	80
4. Processamento e análise de dados.....	81

5. Seleção e treinamento dos auxiliares de pesquisa.....	81
6. Aspectos éticos.....	82
7. Divulgação dos resultados.....	82
8. Cronograma.....	82
9. Orçamento.....	83
10. Referências.....	83

1. Introdução

Segundo Organização Mundial da Saúde, as doenças neurodegenerativas (DND), como a doença de Alzheimer (DA), e desordens da saúde mental, como a depressão, afetam milhões de pessoas globalmente (PRINCE *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos, a DA é a sexta maior causa de mortes por ano, levando a óbito mais indivíduos que os cânceres de próstata e de mama combinados (ASSOCIATION, 2017). Ainda, o DA é a principal causa de demência no mundo, sendo responsável por até 70% dos casos (ASSOCIATION, 2017). Na América Latina, o Brasil é o país com maior prevalência de demência, com aproximadamente 1,6 milhões de pessoas em 2015 (PRINCE *et al.*, 2015). A depressão afeta mundialmente mais de 300 milhões de pessoas, e no Brasil foi diagnosticada em cerca de 11,5 milhões de indivíduos, sendo o país com maior prevalência dessa desordem mental (ORGANIZATION, 2017).

Doenças e desordens dessa magnitude parecem estar relacionadas principalmente com regiões específicas do SNC, como o hipocampo e o córtex cerebral (ARRIAGADA *et al.*, 1992; MUFSON *et al.*, 2015). O hipocampo está localizado no sistema límbico, nos lobos temporais em ambos os hemisférios do cérebro, abaixo do córtex cerebral, sendo responsável pela retenção de informações, criação das memórias de curto e longo prazo, além da aprendizagem e memória espacial (BEAR *et al.*, 2015; MUFSON *et al.*, 2015). Todavia, essas funções podem ser comprometidas por disfunção mitocondrial (RHEIN *et al.*, 2009; SWERDLOW *et al.*, 2010), resultando em estresse oxidativo (PERRY *et al.*, 2002; KUMAR e SINGH, 2015), diminuição do metabolismo energético e produção de citocinas pró-inflamatórias (MEHAN *et al.*, 2012), levando a um aumento de apoptose neuronal e, assim, ao comprometimento de funções cerebrais.

Nesse sentido, os efeitos crônicos do exercício físico aparecem como alternativa não-farmacológica, podendo atuar na reversão dos parâmetros anteriormente mencionados, bem como na proteção do SNC, especialmente no hipocampo e córtex cerebral. Bobinski e colaboradores (2011) reportaram que camundongos que realizaram treinamento aeróbico de intensidade moderada (TACIM) por duas semanas previas e posteriores a lesão espinhal apresentaram

melhor perfil inflamatório e maior quantidade e espessura de fibras mielinizadas quando comparado com grupos que só praticaram exercícios físicos no período pós-operatório. Da mesma forma, Bernardes e colaboradores (2013) expuseram que camundongos que realizaram exercício com sobrecarga na água previamente a indução de um modelo animal de esclerose múltipla, um outro exemplo de DND, exibiram atenuação no pico de severidade da doença.

A prática do exercício físico parece resultar também em melhoras na aprendizagem e na retenção de memórias, as quais são acompanhadas pelo aumento da proliferação e sobrevivência celular no hipocampo de roedores (COTMAN e BERCHTOLD, 2002; VAYNMAN, YING e GÓMEZ-PINILLA, 2004; CREER *et al.*, 2010); efeitos que são mediados, em parte, pelo aumento da produção e secreção do BDNF e seu receptor trkB (LI *et al.*, 2008; ERICKSON, K. *et al.*, 2011). Ainda, estudos têm reportado resultados positivos do TACIM no controle e redução da atrofia no hipocampo, da substância branca e da substância cinzenta cortical em humanos adultos (VOSS *et al.*, 2013; TEN BRINKE *et al.*, 2015).

O BDNF é um tipo de peptídeo que é distribuído em diferentes regiões do SNC (SIAMILIS *et al.*, 2009), o qual exibe papel relevante no desenvolvimento e plasticidade cerebral (WEISHAUPT *et al.*, 2012). O aumento de sua concentração, tanto periférica como central, está diretamente relacionada com a redução de apoptose e atrofia degenerativa de células nervosas (NAGAHARA e TUSZYNSKI, 2011), atuando na prevenção de doenças como o Alzheimer e a depressão (COTMAN e BERCHTOLD, 2002; OGONOVSKY *et al.*, 2005; RADAK *et al.*, 2006). Além disso, sua concentração regula a promoção de neurogênese adulta no hipocampo, mais especificamente na regiões do giro dentado (FAN *et al.*, 2016), desenvolvendo e melhorando a memória espacial, aprendizagem e comportamentos relacionados a depressão e ansiedade (O'LEARY e CRYAN, 2014).

Entretanto, não há um consenso na literatura sobre os efeitos de diferentes protocolos de exercício físico no hipocampo ou outra região do SNC. Há estudos descrevendo a importância do treinamento resistido (TR) na produção de IGF-1 ((BORST *et al.*, 2001; ROJAS VEGA *et al.*, 2010), proteína na síntese de BDNF e VEGF (LLORENS-MARTIN *et al.*, 2009; NIETO-ESTÉVEZ *et al.*, 2016). Contudo, alguns estudos não expõem resultado benéfico desse tipo

de treinamento físico sobre plasticidade cerebral, como evidenciado nos trabalhos de Best e colaboradores (2015) e ten Brinke e colaboradores (2015).

Essa falta de consistência entre os resultados é encontrada também entre estudos com TACIM. Por exemplo, Morris e colaboradores (2017) reportaram que esse tipo de treinamento não foi capaz de aumentar o volume do hipocampo em idosos. No entanto, Niemann e colegas (2014) trabalharam com o mesmo grupo etário e protocolo de treinamento similar, e encontraram um aumento do volume hipocampal como resultado da prática regular desse exercício físico.

Ainda, estudos que adotaram o treinamento intervalado de alta intensidade (TIAI) nos seus protocolos têm reportado achados importantes sobre a germinação de axônios (SABATIER *et al.*, 2008), aumento na concentração de BDNF e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (AFZALPOUR *et al.*, 2015).

1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Determinar os efeitos de seis semanas de TIAI, TACIM, corrida voluntária na gaiola, TR e do sedentarismo sobre a concentração de BDNF, de diferentes enzimas oxidantes e antioxidantes, na modulação do sistema colinérgico e memória de curto e longo prazo em camundongos adultos saudáveis.

1.1.2 Objetivos específicos

- Comparar os efeitos de seis semanas de diferentes protocolos de treinamento e do sedentarismo sobre a concentração de BDNF, de diferentes enzimas oxidantes e antioxidantes (CAT, SOD, TBARS, GPX, ROS), na atividade da acetilcolinesterase, Na⁺/K⁺-ATPase e Ca²⁺-ATPase.
- Identificar relação dose-resposta do volume de atividade física e concentração de BDNF, de diferentes enzimas oxidantes e antioxidantes (CAT, SOD, TBARS, GPX, ROS) e na atividade da acetilcolinesterase, Na⁺/K⁺-ATPase e Ca²⁺-ATPase.

1.2. Hipótese

Espera-se que o TIAI e a atividade física reportem melhores concentrações de BDNF e melhor perfil antioxidante, visto que o padrão de

atividade dos camundongos é de corridas intermitentes e de alta intensidade (GOH e LADIGES, 2015).

Espera-se que a atividade da AchE diminua nos grupos TACIM, TIAI, corrida voluntária e TR.

Espera-se que a memória espacial e de reconhecimento melhore nos grupos TACIM, TIAI, corrida voluntária e TR.

Espera-se encontrar uma relação dose-resposta da atividade física sobre os desfechos analisados.

1.3 Justificativa

O presente estudo justifica-se tendo em visto que a literatura apresenta inconsistências sobre os efeitos de diferentes formas de treinamento físico sobre parâmetros cerebrais, como metabolismo e plasticidade cerebral. Há um corpo de estudos na literatura que sugere o TACIM como um dos modelos de exercício físico com maior capacidade neuroprotetora, sendo capaz de aumento o volume do hipocampo (ERICKSON, K. *et al.*, 2011), elevar as concentrações de neurotrofinas (AFZALPOUR *et al.*, 2015), criação de neurônios e vasos sanguíneos (COTMAN e ENGESSER-CESAR, 2002; LISTA e SORRENTINO, 2010), auxiliar na regeneração da bainha de mielina (FETER *et al.*, 2017), e reduzir o estresse oxidativo no tecido cerebral (ANDERSEN, 2004). Contudo, há ainda estudos que adotaram este protocolo de treinamento e encontraram resultados opostos a estes, quando avaliaram o TACIM no volume hipocampal (MORRIS *et al.*, 2017) e na espessura da bainha de mielina (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Apesar de sua prática regular ser capaz de elevar os níveis de IGF-1 (BORST *et al.*, 2001; LLORENS-MARTIN *et al.*, 2009; NIETO-ESTÉVEZ *et al.*, 2016), ainda não está claro a capacidade do TR em melhorar a capacidade neuroprotetora. Estudos com o de ten Brinke e colaboradores (2015) e Best *et al.* (2015) mostraram que esse tipo de exercício físico não foi capaz de aumentar o volume do hipocampo em idosos. No entanto, Mueller *et al.* (2015) reportou que a prática de TR combinado com o TACIM foi capaz de aumentar o volume cerebral e a concentração de BDNF em indivíduos obesos (MUELLER *et al.*, 2015).

Em relação ao TIAI, um estudo objetivou identificar o efeito da prática de TIAI por seis semanas em neurotrofinas e no sistema inflamatório de ratos Wistar, e comparar esses resultados com os obtidos através do TACIM (AFZALPOUR *et al.*, 2015). O estudo mostrou ambos os treinamentos foram capazes de gerar respostas neuroprotetoras, aumentando a concentração de BDNF, GDNF, fator de necrose tumoral alfa e H₂O₂. Ainda, as alterações encontradas no grupo TIAI foi maior do que as do grupo TACIM. Assim, parece que o TIAI é capaz de gerar efeitos neuroprotetores maiores quando comparado com o TCIAM. Todavia, esse foi o primeiro, e até essa data o único estudo que buscou comparar a respostas desses marcadores entre diferentes modelos de exercícios aeróbicos.

Nesse sentido, visto a inconsistência exposta acima, torna-se relevante investigar e comparar os efeitos entre essas diferentes formas de exercício físico, além da atividade física e do sedentarismo sobre os parâmetros cerebrais envolvidos na proteção do SNC.

2. Fundamentação teórica

2.1 Sistema nervoso: do Egito Antigo ao século XXI

Durante a história da humanidade, diversos cientistas expuseram suas teorias sobre a anatomia e fisiologia cerebral, além da sua relação com o comportamento animal e humano. A figura 1 expõem o famoso papiro datado no século 17 A.C., com a primeira referência ao cérebro na história humana (HUDSPETH *et al.*, 2013). De acordo com James Brestead, o qual foi responsável pela tradução do papiro, a palavra , a qual se refere ao cérebro, é encontrada somente oito vezes na história do Egito Antigo, sendo que nessas duas páginas, a palavra é encontrada seis vezes (HUDSPETH *et al.*, 2013).



Figura 1. O Papiro de Edwin Smith, datado do século 17 A.C.

No século 4 A.C., Hipócrates de Cos, médico da Antiga Grécia e considerado por muitos como uma das figuras mais importantes da história da saúde, expressou a sua opinião sobre a importância do cérebro no documento “Doença Sacra”, traduzido em 1923 por Jones e Withington (1923):

O homem deve saber que, de nenhum outro lugar, se não do cérebro, vem a alegria, o prazer, o riso, a recreação, a tristeza, a melancolia, o pessimismo e as lamentações. E então, de uma maneira especial, adquirimos sabedoria e conhecimento e vemos e ouvimos para saber o que é justo e o que não é, o que é bom e o que é ruim, o que é doce e o que não é sem sabor... E pelo mesmo órgão tornamos loucos e delirantes, e sentimos medo e o terror nos assola... Todas essas coisas provêm do cérebro quando este não é sadio... Dessa maneira sou da opinião de que o cérebro exerce um grande poder sobre o homem (HIPOCRÁTES, 400 AC).

Na era do império Romano, foi um médico grego quem mais contribuiu para a evolução do conhecimento cerebral. Galeno (130-200 AC) concordava com a teoria de Hipócrates sobre o funcionamento cerebral. Apesar de ser o responsável pelo cuidado e tratamento de gladiadores com lesões cerebrais e medulares, suas conclusões eram na maior parte das vezes baseadas nas dissecações de animais, como ovelhas. Em um de seus experimentos, Galeno reportou que o cérebro de uma ovelha era dividido em duas regiões: *cerebrum* e *cerebellum* (BEAR et al., 2015), sendo a primeira região responsável por receber sensações, enquanto a última controlaria as contrações musculares. Galeno sugeriu tal organização visto que para formar memórias, as sensações deveriam

ser formadas em uma região pastosa, como a do *cerebrum*. O mais impressionante é que de acordo com Hudspeth e colaboradores (2013), Galeno estava certo, mas pelas razões erradas. O cérebro de fato é responsável pelas sensações, percepções e memórias, enquanto o cerebelo desempenha importante papel como centro de controle de movimentos.

Duzentos anos após a Idade Média, René Descartes (1596-1650), importante filósofo, matemático e cientista, propôs que a sede da mente (Intelecto) no cérebro seria na glândula Pineal, e que a mente estaria conectada ao resto do corpo. Assim Descartes sugeriu uma nova explicação para o comportamento, no qual o cérebro tinha um papel importante, ao contrário da teoria do *mentalismo* de Aristóteles onde o propósito era apenas de resfriar o sangue.

Para explicar sua teoria, ele sugeriu que a glândula pineal estava localizada no centro do cérebro ao lado de cavidades cheias de líquidos - ventrículos cerebrais. Assim, o corpo pineal direciona líquido dos ventrículos por meios dos nervos, que seriam ocos, até os músculos. Quando o líquido expande os músculos, o corpo se move. Na teoria de Descartes a mente regula o comportamento direcionando o fluxo dos líquidos ventricular para os músculos apropriados. Em sua teoria a mente e o corpo eram entidades separadas e que a Pineal era apenas uma estrutura através da qual a mente trabalhava. Na filosofia essa dualidade passou a se chamar de *problema mente-corpo*, ou apenas de *dualismo*, ou seja, como o comportamento pode ser regulado por uma mente não material e um corpo material.

Baseado nesse mecanismo “hidráulico”, Descartes foi o primeiro a propor a ideia de arco reflexo, e corretamente identificou seus componentes: a sensação de dor, a condução da mesma pelos nervos que levam ao sistema nervoso central, os nervos motores sendo excitados e finalmente os músculos que são responsáveis pela ação. Ele sugeriu que os nervos conduziam o estímulo até o cérebro graças a propulsão do fluído em seu interior oco. Bombeados com esse fluído os músculos se inflavam, levando à contração. O conceito de sua teoria foi, segundo o próprio Descartes, as fontes de Versailles, como descreve no seu livro *Traite de l’Homme*:

E verdadeiramente podemos comparar muito bem os nervos da máquina que estou descrevendo aos tubos dos mecanismos; seus músculos e tendões a vários outros motores e molas que servem para

mover esses mecanismos e seus espíritos animais à água que os movimenta; sendo que o coração é sua fonte, e as cavidades do cérebro, seu encanamento principal de água (DESCARTES, 1664):

Na atualidade, a informação de que determinadas funções cerebrais são desempenhadas por estruturas específicas é amplamente difundida no meio científico e clínico. Essa doutrina, chamada de *Localizacionismo* cerebral, tem sido comprovada pela evolução de exames de imagens como ressonância magnética funcional, tomografia por emissão de positron, entre outros, que com precisão, visualizam funções cerebrais durante diferentes estímulos no corpo.

Essa comprovação, porém, é recente. Durante séculos, a teoria de Descartes predominou como a mais aceita na área médica. Foi então que Franz Joseph Gall (1758-1822), médico e neuroanatomista austríaco e um dos primeiros a ilustrar com precisão as circunvoluções corticais propôs que o córtex possuía zonas anatomicamente definidas, e que diferentes funções do córtex se localizam em diferentes regiões. Gall propôs três ideias radicais: a primeira, que todo comportamento emanava do cérebro. A segunda, que determinadas regiões do córtex cerebral controlavam funções específicas, sendo que o córtex cerebral não agia como um órgão único, mas era dividido em pelo menos 27 órgãos e cada um correspondendo a uma faculdade mental específica. A terceira, que se mostrou totalmente sem comprovação científica, que o centro de cada função, crescia com o uso, sendo que o crânio que o recobre incharia proporcionalmente, criando um padrão de saliências e sulcos que indicariam quais regiões do encéfalo foram mais desenvolvidas.

Atualmente, sabe-se que o SNC e periférico, sendo o primeiro conceituado como o conjunto do encéfalo e da medula espinhal. É para essa região que as informações relacionadas aos sentidos (audição, visão, olfato, paladar e tato) são enviadas e destinadas aos músculos e glândulas (BEAR *et al.*, 2015).

No centro desse complexo sistema destaca-se o encéfalo. Este é formado por três partes: cerebelo, tronco encefálico e telencéfalo, sendo a região que se encontra protegida pela caixa cranial é conhecida como cérebro (HAINES *et al.*, 2011). Durante o desenvolvimento fetal, o encéfalo é dividido em três partes: prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. Após o desenvolvimento do SNC, o prosencéfalo se divide em diencéfalo e o telencéfalo (Figura 2).

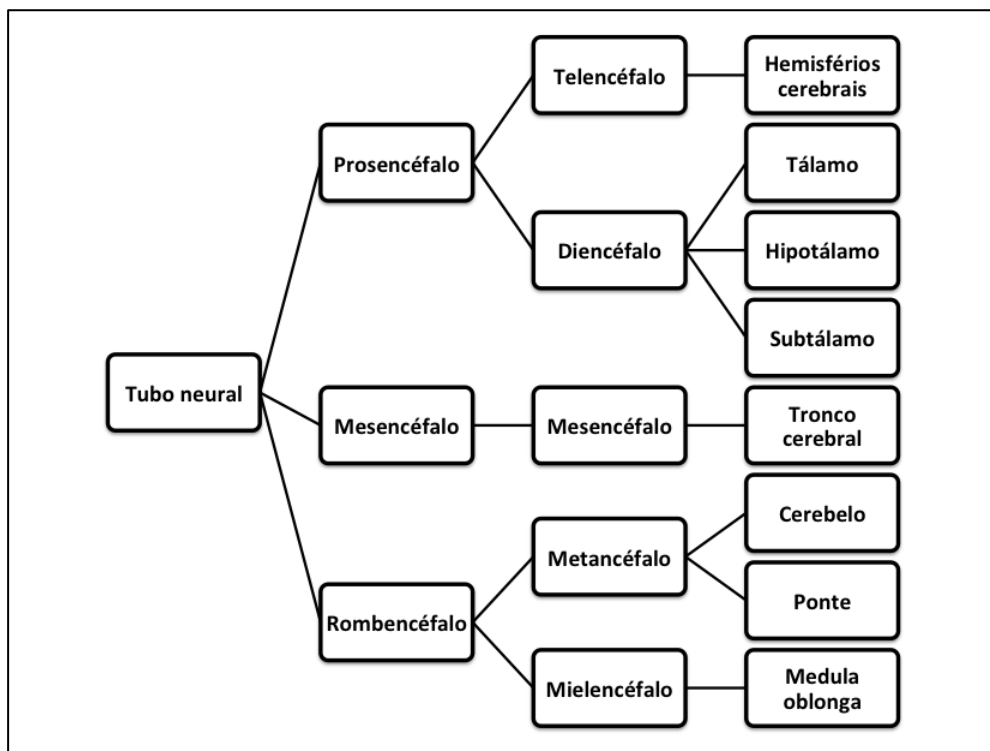


Figura 2. Desenvolvimento do cérebro.

O telencéfalo, ou córtex cerebral, é a maior parte do encéfalo, sendo dividido pelo corpo caloso em dois hemisférios: direito e esquerdo (BEAR *et al.*, 2015). Todavia, grupos de fibras nervosas subcorticais são capazes de passar por diferentes áreas em um hemisfério, criar conexões nervosas entre eles (fibras comisurais), e de projetar-se de forma ascendente e descendente para receber e enviar informações para as regiões mais caudais do SNC (BERNARDES *et al.*, 2013). Adicionalmente, o recebimento de informações sensoriais no telencéfalo ocorre de forma cruzada, ou seja, as sensações e movimentos de uma lado do corpo são controlados pelo cerebral contrário (HAINES *et al.*, 2011).

O córtex cerebral desempenha importante função sobre a memória, atenção, percepção, cognição, pensamentos, linguagem e consciência (HUDSPETH *et al.*, 2013). É nessa região do cérebro também onde está localizado o corpo celular dos neurônios (soma). Assim, de forma a acomodar todas essas células, sua área precisa ser extensa, mas é limitada pela capacidade do crânio. Dessa forma, sua superfície é repleta de “dobras”, as quais originam os sulcos e os giros (HAINES *et al.*, 2011).

Histologicamente, as células do córtex cerebral são organizadas em camadas, sendo que em cada uma predomina um tipo de célula. No córtex

podemos encontrar áreas com três camadas (paleocortex e aquicortex) e seis camadas (neocortex). O último é a área mais desenvolvida do nosso SNC, e é devido a sua plasticidade e capacidade sináptica que permite aos seres humanos serem seres pensantes (HAINES *et al.*, 2011; HUDSPETH *et al.*, 2013; BEAR *et al.*, 2015).

O diencefalo é formado pelo hipotálamo, tálamo e subtálamo. O hipotálamo desempenha papel importante da regulação de processos metabólicos, ligando o SNC ao sistema endócrino (BEAR *et al.*, 2015). O tálamo está localizado entre o córtex e o mesencéfalo, sendo formado basicamente por substância cinzenta e branca (Figura 3). A primeira é composta pela aglomeração do núcleos das células nervosas (HAINES *et al.*, 2011), e pode ser vista na camada externa do córtex cerebral. A substância branca é formada por axônios que se deslocam de uma região para outra, e geralmente mielinizados, gerando assim uma aparência esbranquiçada. No SNP, um aglomerado de axônios é chamado de nervo (HAINES *et al.*, 2011; BEAR *et al.*, 2015).

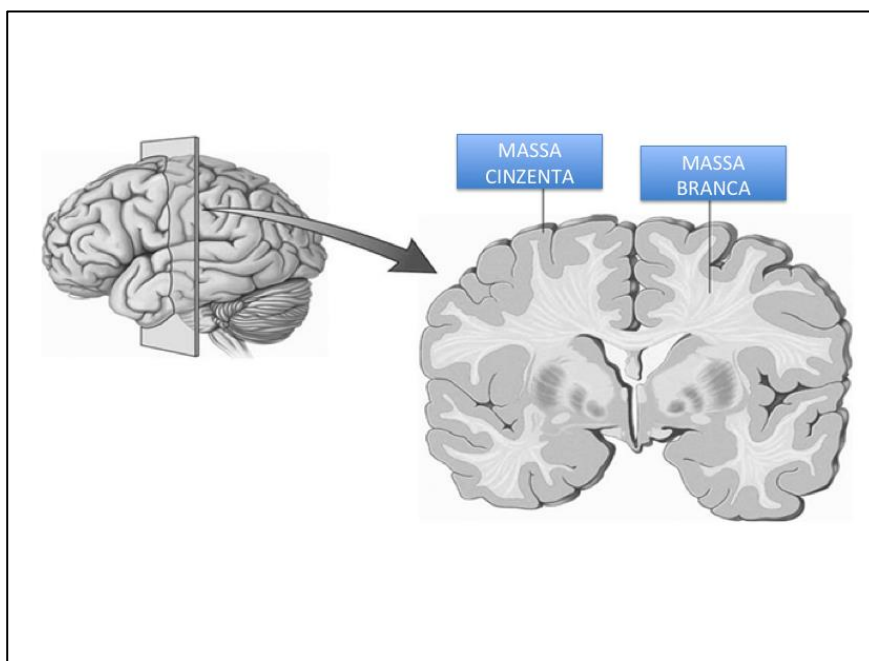


Figura 3. Massa cinzenta e massa branca (Disponível em <https://www.portalsaofrancisco.com.br/corpo-humano/neuronios>).

Cada hemisfério do telencéfalo pode ser dividido em lobos, que recebem os nomes de acordo com o osso do crânio que os cobrem (Figura 4):

- Lobo frontal: o maior lobo do cérebro, regula atividade motora voluntária e a decisão de qual movimento realizar para uma específica tarefa;
- Lobo parietal: regula funções somatosensórias e a orientação espacial, incluindo auto-percepção e interação com o ambiente.
- Lobo occipital: primeiramente envolvido no processamento de informação visual.
- Lobo temporal: Relacionado no processamento de informação auditiva. Importante em aspectos da aprendizagem, memória e emoção.

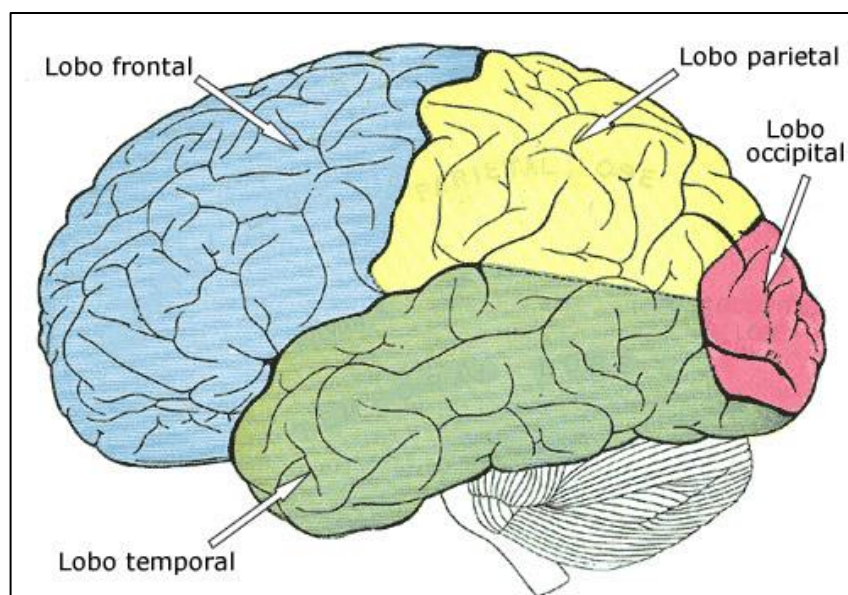


Figura 4. Lobos cerebrais (Disponível em <https://www.infoescola.com/anatomia-humana/lobos-cerebrais/>)

Ainda, em uma camada mais profunda do telencéfalo, é possível encontrar duas estruturas: núcleos de base e o sistema límbico. O núcleo de base é o conjunto de núcleos neuronais, e o dano a essa estrutura acarreta na perda de movimentos voluntários (BEAR *et al.*, 2015).

O sistema límbico é formado pela amígdala e pelo hipocampo. As amígdalas são grupo de neurônios que formam massa de substância cinzenta. Sua função é conectar as percepções com respostas viscerais e comportamentais e memória (HAINES *et al.*, 2011). O hipocampo, localizado na região cortical, desenvolve um papel importante no sistema límbico e está envolvido na formação de novas memórias, aprendizagem e emoções.

2.2 Hipocampo

Em um artigo publicado em 1878, o neurologista francês Paul Broca notou que na superfície medial do cérebro de mamíferos havia uma área que se diferenciava do córtex ao redor. Para descrever a diferença observada, o mesmo utilizou a palavra em latim “limbus”, que significa borda, em razão do formato de anel que aquela área possuía ao redor do tronco cerebral.

O hipocampo tem chamado a atenção desde as primeiras dissecações no antigo Egito (ANDERSEN, 2007), e recebeu esse nome justamente em razão do seu formato curvado apresentado, se assemelhando a um cavalo-marinho (Grego: *hippos* = cavalo, *kampi* = curva) (Figura 5a). O anatomista veneziano Julius César Aranzi (1529) foi o primeiro anatomista a descrever distintamente o cornus inferior dos ventrículos do cérebro que reconhece os objetos pelos quais eles se distinguem e também quem nomeou essa estrutura pelo nome pelo qual são conhecidas ainda hoje. Em 1564, Aranzi comparou o hipocampo em um primeiro momento com o bicho da seda e depois com um cavalo marinho, semelhanças que também foram observadas pelo anatomista alemão Duvernoy (1729) (ANDERSEN, 2007; HUDSPETH *et al.*, 2013; BEAR *et al.*, 2015).

No início do século XVIII, o anatomista dinamarquês Jacob Winsløw e seu colega parisiense, o cirurgião de Garengnot, descreveram a parte superior do hipocampo como “cornu Ammonis” ou “chifre de Amon”, uma referência ao chifre do deus egípcio antigo Amon, que era representado como tendo uma cabeça de carneiro. Em razão disso, as sub-regiões do hipocampo são abreviadas como CA (ANDERSEN, 2007).

Ainda, o hipocampo está localizado em uma região profunda do lobo temporal medial e compreende um grupo de milhões de neurônios organizados em uma maneira distinta, quando comparado com outras regiões do tecido cerebral; no entanto, sua formação é semelhante em diferentes espécies de mamíferos (ANDERSEN, 2007), sendo constituído pelo giro dentado e as sub-regiões CA1, CA2 e CA3 (Figura 5b).

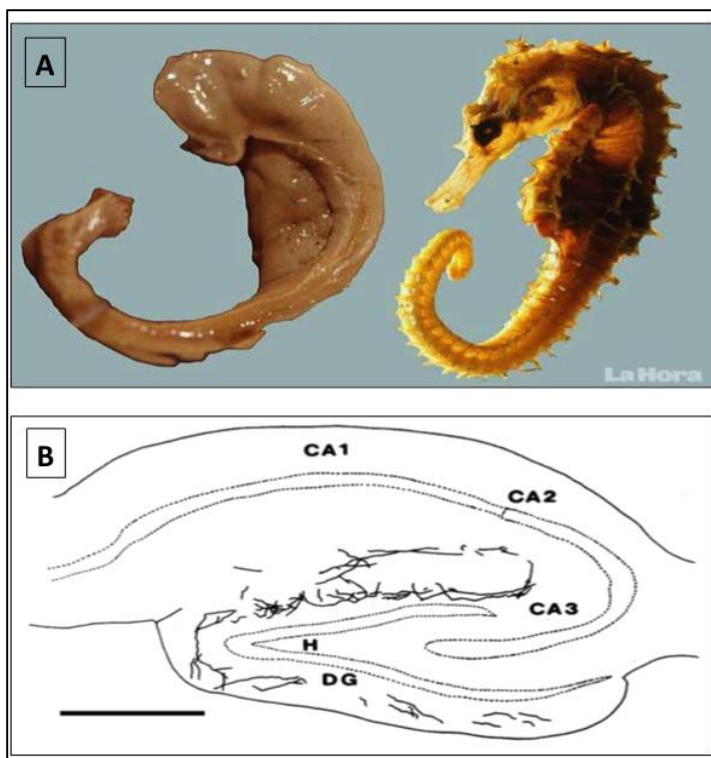


Figura 5. A: Comparação do formato do hipocampo com um cavalo-marinho. B: Regiões do hipocampo: CA1, CA2, CA3 e DG (giro dentado) <http://centauroalado.blogspot.com/2016/12/hipocampo-o-cavalo-marinho-da-memoria.html>.

O giro denteado e CA3 aparentam estar envolvidos na separação de padrões (LEUTGEB *et al.*, 2007), ou seja, na codificação de eventos similares em representações diferentes (O'REILLY e RUDY, 2001; EICHENBAUM, 2004), permitindo ao hipocampo evitar que memórias sofram interferência de outras, mesmo que sejam parecidas. Ainda, a região CA3 também atua no completamento de padrões, que se traduz como a evocação de uma memória na presença de um estímulo que facilite a lembrança do evento já vivenciado, mesmo que não seja idêntico a ele (LEUTGEB *et al.*, 2007; ROLLS, 2013).

A sub-região CA2 tem sido apontada como importante para a memória social, que seria a capacidade de reconhecer um animal da mesma espécie (STEVENSON e CALDWELL, 2014; OLIVA *et al.*, 2016; PISKOROWSKI *et al.*, 2016). Um estudo conseguiu analisar as conexões sinápticas de CA2 em camundongos transgênicos. A inativação desta área através da manipulação genética fez com que os animais preservassem inteiramente outras funções relativas à memória espacial e contextual, mas prejudicassem o processamento da memória sociocognitiva (HITTI e SIEGELBAUM, 2014).

Como peça chave na memória episódica, a separação temporal também está presente no hipocampo, e estudos demonstraram que CA1 parece exercer esse papel (KESNER e HUNSAKER, 2010; BARBOSA *et al.*, 2012; HITTI e SIEGELBAUM, 2014), embora também pareça exercer um papel no componente espacial em uma tarefa associativa de memória similar à episódica (BARBOSA *et al.*, 2012). A sub-área CA1 dorsal é considerada a maior via de saída do hipocampo para o neocórtex e possui vias que a ligam a CA3 e ao córtex entorrinal (AGSTER e BURWELL, 2009; 2013).

Estudos demonstram diferentes papéis do hipocampo em tarefas de reconhecimento de objetos padrão. Animais com lesões permanentes no hipocampo parecem conseguir resolver este tipo de tarefa da mesma forma que animais controle (MUMBY *et al.*, 2002; AINGE *et al.*, 2006; BARKER e WARBURTON, 2011), no entanto, um estudo demonstrou que a inativação temporária de CA1 através do agonista GABA_A muscimol danificou o padrão de exploração na tarefa para a aquisição, consolidação e evocação (COHEN e STACKMAN JR, 2015).

DeVito e Eichenbaum (DEVITO e EICHENBAUM, 2010) demonstraram que uma lesão envolvendo o hipocampo dorsal e ventral, abrangendo as subáreas CA1, CA2, CA3, o giro dentado e o subículo, prejudica a utilização dos três componentes (“o quê”, “onde” e “quando”) da tarefa para camundongos. Mais recentemente, De Souza Silva e colaboradores demonstraram que lesões contralaterais no córtex pré-frontal medial e CA3 prejudicaram todos os aspectos da tarefa de memória similar à episódica integrativa, enquanto que lesões ipsilaterais os mantiveram intactos (DE SOUZA SILVA *et al.*, 2015). Além disso, tanto lesões ipsilaterais quanto contralaterais não prejudicaram os padrões de tarefas não associativas.

2.3 Estresse oxidativo

A Teoria do Envelhecimento e do Estresse Oxidativo de Harman (HARMAN, 1956), sugere que ao longo da vida ocorre o acúmulo de radicais livres, produzidos pela mitocôndrias, gerando um desequilíbrio progressivo entre estresse oxidativo e defesas antioxidantes (a favor da ação pró-oxidante). Para a teoria, o processo de envelhecimento é uma mudança irreversível e deletéria resultante da produção de radicais livres ao longo da vida. Essa hipótese dos

radicais livres e do estresse oxidativo tem sido muito estudada nos últimos anos como uma possível explicação para o processo de envelhecimento (HARMAN, 1956; TIANA ET AL., 1998; LIOCHEV, 2013) (Figura 6). Vários estudos em animais demonstram que o aumento da idade é acompanhado pelo desequilíbrio pró radicais livres em relação às defesas antioxidantes teciduais (SANZ *et al.*, 1997; FLOYD E HENSLEY, 2002; SAVITHA *et al.*, 2005).

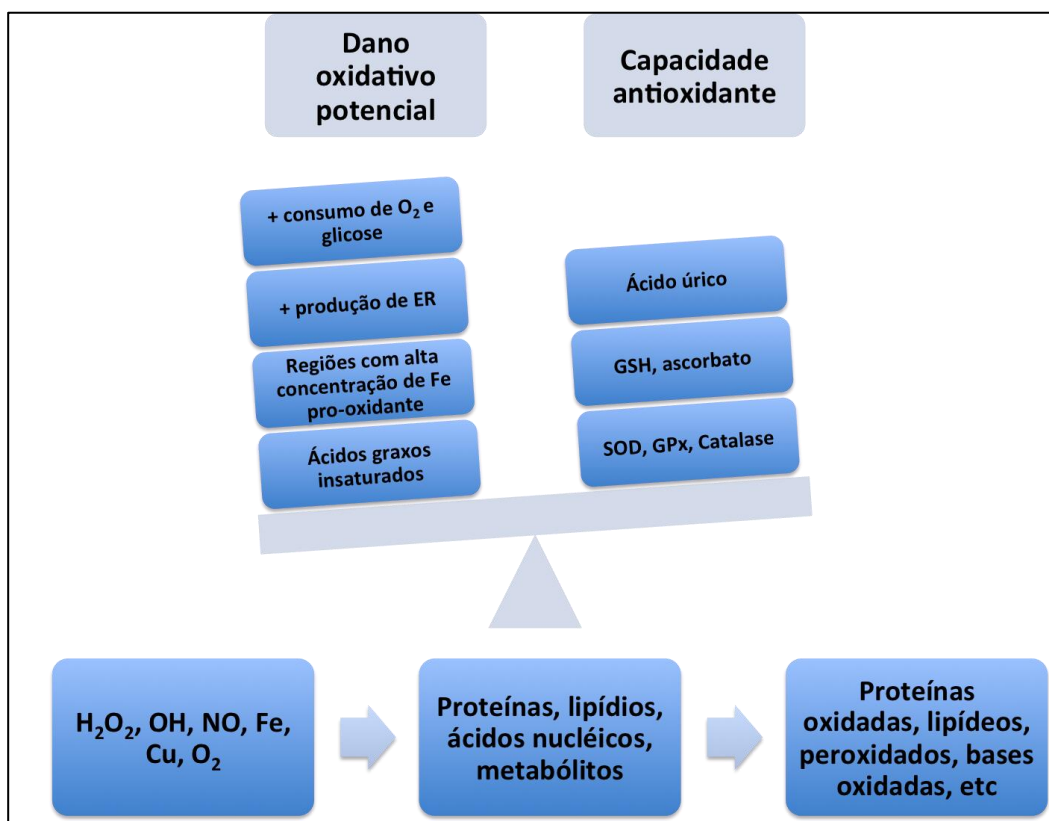


Figura 6. Representação esquemática do estresse oxidativo celular. As espécies oxidantes são produzidas e interagem com os alvos celulares gerando produtos de oxidação, e estes, em alguns casos, causam estresse oxidativo nos tecidos. ER: espécies reativas; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; OH: radical hidroxila; NO: óxido nítrico; Fe: ferro; Cu: cobre; O_2^- : radical ânion superóxido; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: glutathione. Adaptado de HENSLEY e FLOYD (2002).

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_2O_2) (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 (SIES, 1997). 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) (Figura 7).

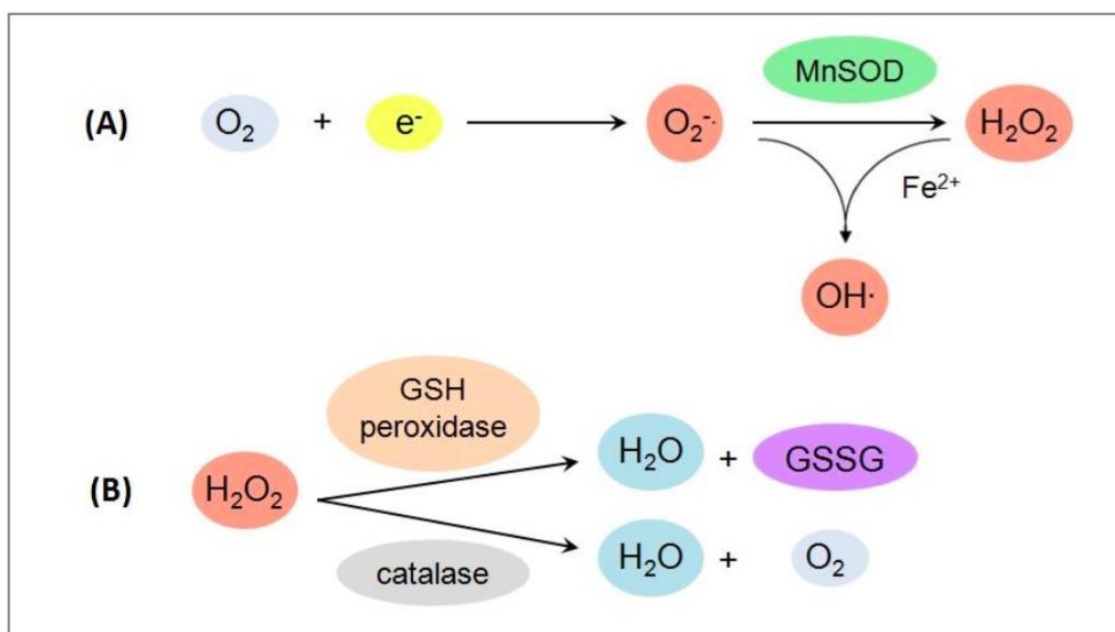


Figura 7. Desenho esquemático da formação de espécies reativas nas células. (A) Formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a partir de oxigênio (O_2) e elétrons de alta energia. O $O_2^{\cdot-}$ pode ser convertido pela superóxido dismutase (MnSOD) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou pela 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 glutathiona oxidada (GSSG) pela enzima glutathiona peroxidase (GSH peroxidase). Adaptado de MIGLIORE e COPPEDÈ (2009).

A SOD integra um grupo de metaloenzimas e atua contra os efeitos negativos das EROs, convertendo o ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio, protegendo, assim, as células aeróbicas (Figura 7a). Esta enzima ocorre em dois compartimentos distintos das células eucariontes: no citoplasma, associada ao cobre e zinco; na matriz mitocondrial, associada ao manganês (KINNULA, 2005; RAHMAN *et al.*, 2006).

A GSH exerce funções essenciais à célula, como, por exemplo, seu papel de cofator no ciclo redutor das glutathionas, mediante a doação de átomos de hidrogênio durante a redução de peróxidos pela GPx, transformando-se, assim,

em glutathiona oxidada - GSSG (Figura 7b) (COMHAIR e ERZURUM, 2002). Assinala-se que a inativação de um agente oxidante pode gerar a produção de GSSG e também a depleção de GSH, e, em situações de excesso de agentes oxidantes e de algum tipo de deficiência do sistema antioxidante, haverá desequilíbrio entre a produção de GSSG e o consumo de GSH (ROWNTREE *et al.*, 2004).

Acerca da CAT, esta é uma metaloproteína que se encontra, no geral, nos peroxissomos e atua por intermédio da conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, complementando a ação da GPX (KINNULA, 2005).

A GPx também funciona como mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a GSH à GSSG, removendo H_2O_2 e formando água (FERRARI *et al.*, 1985).

O estresse oxidativo é apontado também como o maior limitador da longevidade (HARMAN, 2002; JI, 2002) estando associado à várias patologias relacionadas ao envelhecimento, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (ANDERSEN, 2004) e outras (BETTERIDGE, 2000; HALLIWELL, 2012).

O estresse oxidativo também está relacionado com declínio de memória associado à idade (JURGENS e JOHNSON, 2012). O cérebro é particularmente suscetível aos efeitos das espécies reativas, 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 DND. 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; JURGENS e JOHNSON, 2012).

2.4 Metabolismo energético cerebral

Segundo a literatura (GROSSMAN *et al.*, 2001; CÁCERES *et al.*, 2003; GROSSMAN *et al.*, 2004; UDDIN *et al.*, 2004), o córtex cerebral se expandiu durante a evolução primata em razão de adaptações metabólicas, como na regulação de genes e metabólitos envolvidos no metabolismo oxidativo e funções mitocondriais no cérebro humano. Também, o envelhecimento saudável é

marcado pela diminuição das taxas de metabolismo de glicose e oxigênio (HUDSPETH *et al.*, 2013), mas esse declínio é acentuado em doenças neurodegenerativas como Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, Parkinson e Huntington (HOYER, 1982). Assim, compreender os mecanismos energéticos nas células cerebrais e como o cérebro se adapta a demanda ambiental é relevante a fim de elucidar a relação entre o declínio energético acentuado e o aparecimento de DND (HARRIS *et al.*, 2012).

Apesar de representar somente 2% do peso corporal, o tecido cerebral é responsável por 20% do consumo total de oxigênio e glicose (HUDSPETH *et al.*, 2013). Entre as células cerebrais, a energia total é distribuída em 80% para os neurônios, sendo os 20% restantes distribuídos entre células gliais, microglia, oligodendrócitos, e astrócitos (HARRIS *et al.*, 2012). Devido a essa alta demanda energética, o cérebro necessita de fluxo sanguíneo contínuo transportando substratos. Assim, para regular a troca de moléculas entre os fluídos cerebral e sanguíneo, existem duas barreiras: a barreira hematoencefálica (BBB) e a barreira sangue - líquido cefalorraquidiano (HAINES *et al.*, 2011).

Uma das principais tarefas da BBB é proteger o cérebro do resto do corpo, isolando-o de flutuações de nutrientes, metabólitos e outras substâncias que causariam danos nas funções cerebrais, como os linfócitos (HAINES *et al.*, 2011). Ainda, exerce papel na manutenção da homeostase no tecido cerebral, para que o órgão possa funcionar corretamente. É formada por células endoteliais interligadas por junções apertadas e o contato com a corrente sanguínea é realizado por astrócitos. O transporte energético é feito por difusão para moléculas lipofílicas, água e gases, sendo que as demais substâncias, como proteínas, aminoácidos, hormônios, e fatores de crescimento, necessitam de transporte ativo para ultrapassar essa barreira (JUNQUEIRA *et al.*, 2000). Devido a utilização deste transporte, ocorre a hidrolização de ATP e o transporte dessa substância para o interior da membrana principalmente através de duas famílias de transportadores: do tipo ABC e SLC (*solute carrier*). A primeira família de transportadores de membrana é composta por proteínas que tem como função mover moléculas solúveis em lipídios contra seu gradiente por meio de ligação com ATP hidrolisado (ABBOTT *et al.*, 2010). Os substratos dos membros da superfamília SLC são tipicamente ânions orgânicos e cátions, e utilizam como

fonte de energia o gradiente quimiosmótico formado pela translocação de íons através da membrana para realizar o influxo de substrato para dentro da célula.

No metabolismo cerebral, o GLUT e MCT, da família dos SLC, desempenham papel-chave no transporte de glicose e ácidos monocarboxílicos, respectivamente. Para que a glicose seja enviada para cada uma das diferentes regiões no SNC, o GLUT possui diferentes isoformas (Figura 8): GLUT1 é responsável pela entrega de glicose no cérebro (55-kD) e nas células gliais, epêndima e plexo coróide; GLUT2 sinaliza a busca por glicose em situações de hipoglicemia, e é encontrado principalmente em neurônios glutamatérgicos no hipotálamo (LABOUÈBE *et al.*, 2016); GLUT3 é concentrado predominantemente no axônio e dentrítos e possui maior afinidade e capacidade de transporte com glicose. Essa característica garante aos neurônios o recebimento constante de glicose, mesmo em situações em que a concentração de glicose é baixa. O GLUT1 e GLUT3 são os principais transportadores de glicose no SNC em razão de suas concentrações e afinidade com o substrato; contudo, existem outras formas desse transportador no SNC. O GLUT4 é localizado em neurônios, astrócitos e células endoteliais; GLUT5 nas microglias; GLUT6 em neurônios; GLUT7 nos astrócitos; e o GLUT8 é responsável pelo envio de glicose em neurônios localizado no hipocampo, amígdala, cerebelo e hipotálamo (REAGAN *et al.*, 2001; IBBERSON *et al.*, 2002).

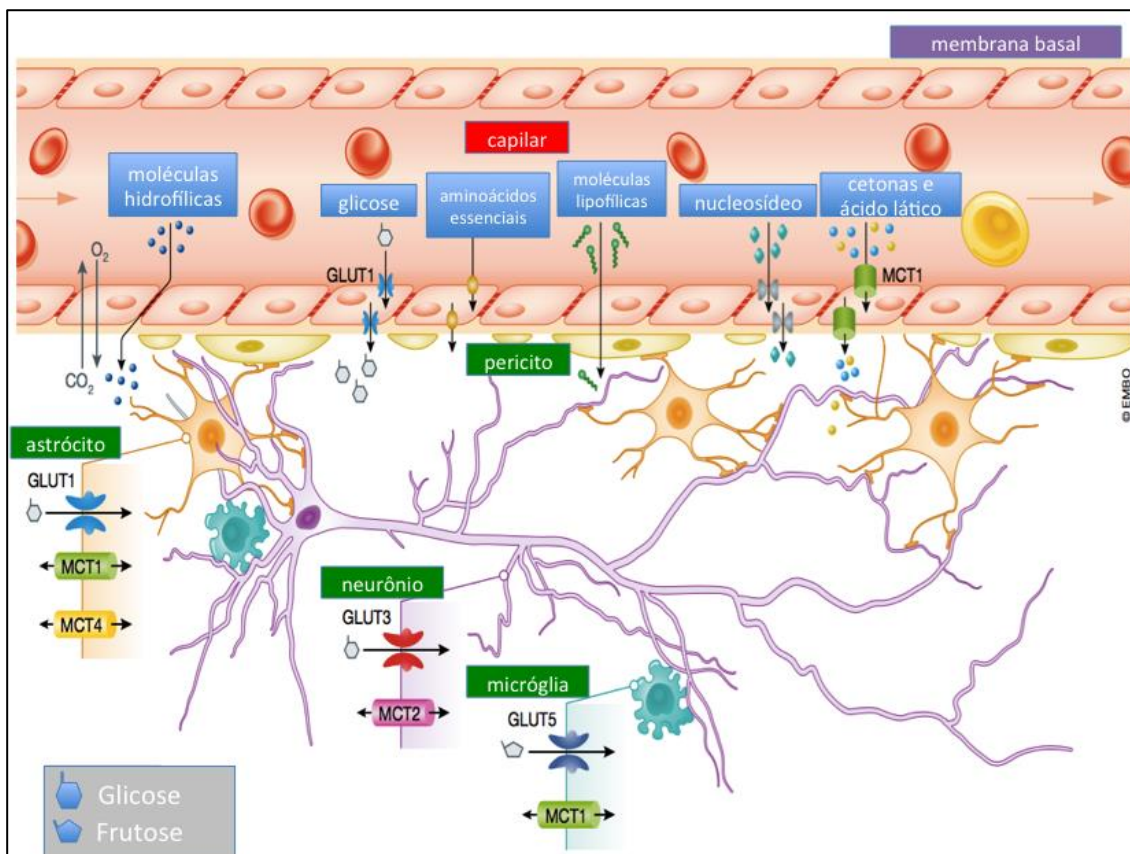


Figura 8. A barreira hematoencefálica é formada por células endoteliais cercadas pela membrana basal, pericitos e por astrócitos perivasculariais. A presença de junções apertadas entre as células endoteliais inibe fortemente a penetração de moléculas solúveis em água. A difusão passiva é limitada aos gases e aos pequenos lipídios não polares. Todos os outros nutrientes requerem transporte passivo ou ativo. GLUT 1-5: transportador de glicose; MCT1 1-4: transportador de ácido monocarboxílico. Adaptado e traduzido de Camandola e Mattson (2017).

A diminuição dos níveis de glicose, particularmente nas regiões do córtex cerebral e hipocampo têm sido relatados agudamente após a indução de um modelo animal para a Doença de Alzheimer (PATHAN *et al.*, 2006), gerando um dano no metabolismo energético e, conseqüentemente, disfunção mitocondrial (AGRAWAL *et al.*, 2009). Estudos realizados com camundongos *knockout* para GLUT1 apresentaram redução no volume cerebral e alteração no comportamento motor (WANG *et al.*, 2006), enquanto animais *knockout* para GLUT3 resultou em dano na memória de trabalho e aprendizagem espacial, além de demonstrar características da desordem do espectro autista (ZHAO *et al.*, 2010). Ainda, complicações no metabolismo de glicose no hipocampo através da inibição de GLUT8 acarretaram em redução no volume do hipocampo e dificuldade na locomoção (MEMBREZ *et al.*, 2006).

Ainda, além de alterações morfológicas no SNC, modelos animais de DND mostram uma queda na atividade do sistema colinérgico, afetando a memória espacial e aprendizagem desses animais (MUFSON *et al.*, 2008). O sistema colinérgico é composto de células nervosas que utilizam o neurotransmissor Ach na transdução de potenciais de ação. Essas células contêm e liberam acetilcolina durante a propagação de um impulso nervoso. A acetilcolina participa também do processamento de memória no estriado, além de influenciar a formação de memórias declarativas (CARTA *et al.*, 2006).

O processo de síntese da Ach se inicia na transferência de um grupo acetil de uma molécula de acetil CoA, proveniente da metabolização celular da glicose, para uma molécula de colina (Figura 9). Esta reação é catalisada pela enzima colina acetiltransferase, presente principalmente no citoplasma da célula colinérgica. A ACh é então armazenada em vesículas pelo transportador vesicular de acetilcolina, que utiliza o gradiente eletroquímico da bomba H^+ -ATPase e realiza a troca de dois prótons H^+ presentes no lúmen vesicular por uma molécula de ACh do citoplasma. Na fenda sináptica, a AChE hidrolisa a ACh e a colina liberada é então reciclada após captação pelo transportador de colina de alta afinidade do neurônio colinérgico (HUDSPETH *et al.*, 2013).

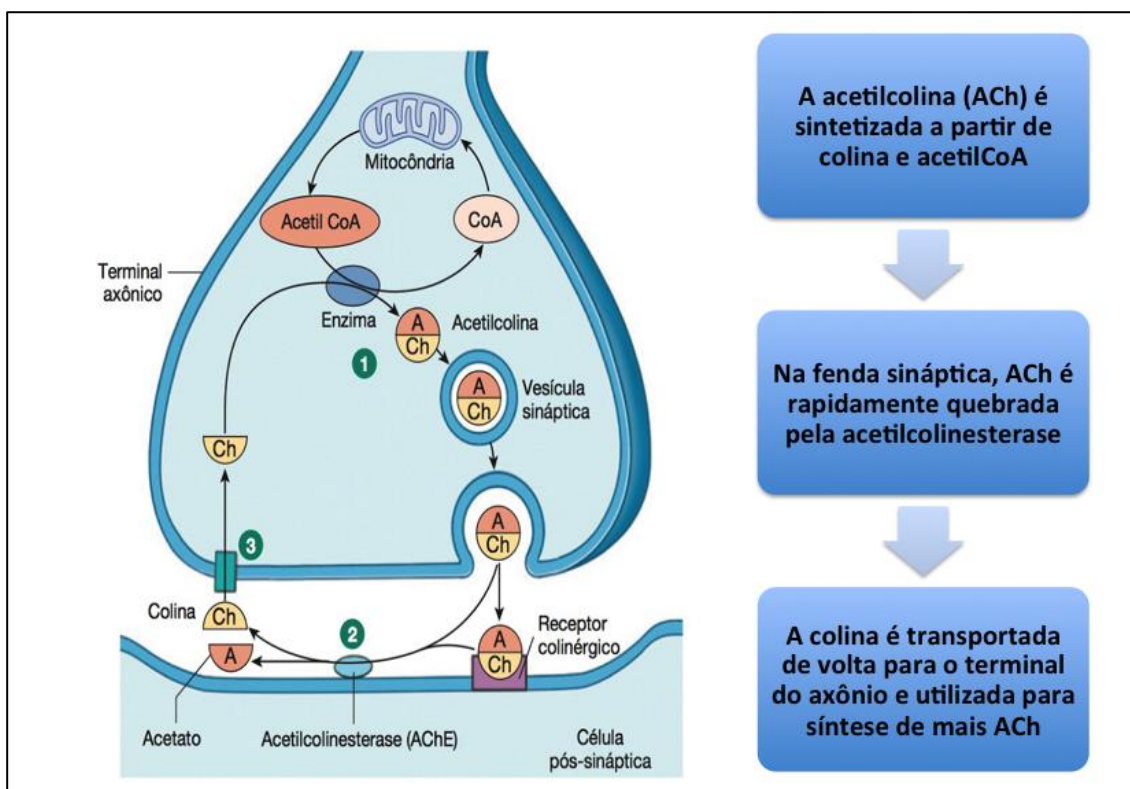


Figura 9. Processo de síntese de acetilcolina na sinapse. Adaptado por Berne e colaboradores (2010).

Estudos realizados com humanos e animais indicaram que ativação colinérgica originada no prosencéfalo basal medeia a capacidade de atenção sustentada (SARTER *et al.*, 2001). Além disso, o sistema colinérgico atua como modulador do nível de processamento atencional de estímulos relacionados à ameaça (BERNTSON *et al.*, 1998), enquanto projeções específicas a partir do córtex pré-frontal medial influenciam as respostas de ansiedade (BERNTSON *et al.*, 1998). Em razão disso, a acetilcolina também afeta memória de trabalho e os processos atencionais necessários para a detecção de erros (SARTER *et al.*, 2006). O processamento emocional também está intimamente relacionado a este sistema, visto a influência de estímulos colinérgicos no córtex frontoparietal na atenção direcionada para a informação emocional (BERNTSON *et al.*, 1998).

A abordagem farmacológica através de inibidores de AChE tem sido amplamente utilizada. Como exemplo, são descritos a tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina. O uso desses medicamentos leva ao aumento da função colinérgica central por meio da inibição das enzimas que degradam o neurotransmissor ACh, melhorando sua disponibilidade e sua capacidade de

estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais (GROSSBERG, 2003).

Visto a importância do sistema colinérgico sobre algumas das principais funções cognitivas, mecanismos degenerativos que o afetem, como nas DND, resultam no comprometimento do desempenho cognitivo relacionado à memória, atenção e funcionamento executivo (BULLARD *et al.*, 2012). Portanto, encorajar o desenvolvimento de estratégias não-farmacológicas com a perspectiva de regular a disponibilidade de ACh no SNC é necessário a fim de combater os transtornos cognitivos originados por DND

A enzima Na^+, K^+ -ATPase, também conhecida como bomba de sódio e potássio, é uma proteína ligada à membrana com propriedades catalíticas. Seu papel é transportar ativamente três íons de sódio para fora da célula e dois íons de potássio para dentro, contra seus gradientes de concentração, consumindo então uma molécula de ATP (SKOU, 1957; KAPLAN, 2002). Dessa forma, essa proteína garante a sobrevivência das células atuando na manutenção da homeostase dos eletrólitos intracelulares em praticamente todos os tecidos, como SNC, visando a manutenção do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática (LINGREL e KUNTZWELER, 1994; LINGREL *et al.*, 1994). Este gradiente atua como fonte energética para manutenção do potencial de repouso e da excitabilidade neuronal, bem como na regulação do pH intracelular e no volume da célula (GEERING, 1990).

No mesmo sentido, alguns estudos têm demonstrado que a Na^+, K^+ -ATPase exerce influência sobre o processamento de memória (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 Na^+, 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 Na^+, 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.*, 2002; 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. 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 (ARAUJO *et al.*, 1990).

Ademais, a Na⁺/K⁺-ATPase possui também relevante função na plasticidade sináptica, na potencialização de longa duração (LTP) (GLUSHCHENKO e IZVARINA, 1997) e no aprendizado e memória em diferentes tarefas (WYSE *et al.*, 2004). Desta forma, se há diminuição de sua atividade, a neurotransmissão e a atividade neural são prejudicadas (LEES *et al.*, 1990; JAMME *et al.*, 1995; VAILLEND *et al.*, 2002).

Da mesma forma, a literatura descreve que a inibição da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase induz ao aumento de Ca²⁺ intracelular e o estabelecimento de insultos excitotóxicos (GREENE e GREENAMYRE, 1996; VELDHUIS *et al.*, 2003), prejudicando assim a memória em ratos (SATO *et al.*, 2004; ZHAN *et al.*, 2004). Além disso, sua inibição está envolvida com o aparecimento e desenvolvimento de DND (KUMAR e KURUP, 2002). Por exemplo, estudos revelam uma diminuição tanto na expressão (CHAUHAN *et al.*, 1997) quanto na atividade desta enzima em humanos com doença de Alzheimer (LIGURI *et al.*, 1990).

A enzima Ca²⁺-ATPase também é uma ATPase localizada na membrana celular e atua na manutenção das concentrações de Ca²⁺ citoplasmáticas por meio da extrusão do Ca²⁺ intracelular (FAKIRA *et al.*, 2012; LUKYANETS e LUKYANETZ, 2013). Também, influxo excessivo de íons de cálcio, aumento de suas concentrações intracelulares e diferenças de afinidade da Ca²⁺-ATPase para íons Ca²⁺ são reportados em modelos animais de DND (RIZOPOULOS *et al.*, 1988; CHIN *et al.*, 2006; VIGNINI *et al.*, 2007).

O envelhecimento está associado também com uma redução na expressão da regucalcina, uma proteína ligante do cálcio, que regula as concentrações intracelulares de Ca^{2+} e a atividade da Ca^{2+} -ATPase (YAMAGUCHI, 2012). O envelhecimento cerebral resulta um aumento no estresse oxidativo associado a membrana, que por sua vez prejudica a atividade das enzimas ancoradas a membrana. A redução na atividade destas enzimas reduz o desenvolvimento de neuritos, aumentando a susceptibilidade neuronal ao estresse celular favorecendo o desenvolvimento de DND. A maioria das eferências colinérgicas parte do prosencéfalo basal, área formada por centenas de neurônios que se projetam ao hipocampo, neocortex, partes do córtex límbico e amígdala e modulam as funções cognitivas (MCKINNEY, 2005).

A literatura evidencia que a manutenção da função cognitiva durante o envelhecimento depende da formação de reservas cognitivas e estruturais (NILSSON e PEKNY, 2007), servindo para a construção de uma resiliência cognitiva, que pode ser entendida como uma forma de resistência a possíveis problemas cognitivos. Essas reservas são construídas a partir de estimulações sociais, motora (como prática de atividade física), sensoriais e cognitivas e são essenciais para a manutenção da memória durante o envelhecimento saudável e a redução do aparecimento dos sinais iniciais de demência. Do ponto de vista biológico, essas reservas se traduzem no aumento da expressão de proteínas, como as neurotrofinas, ou melhora da funcionalidade de sistemas de neurotransmissores envolvidos na modulação da memória.

Em estudos com animais, tem sido encorajado a utilização de ambientes enriquecidos para promover a formação de reserva cognitiva. A exposição a esse tipo de ambiente pode modular a plasticidade sináptica no hipocampo, aumentando tanto a potenciação de longo prazo (LTP), quanto a depressão de longo prazo (LTD). O estresse agudo, por sua vez, reduz a capacidade de indução de LTP, podendo esta redução ser revertida com ambiente enriquecido (ARTOLA *et al.*, 2006). Ambientes ditos enriquecidos oferecem diversos estímulos de variados graus de dificuldade e tipicamente consistem de componentes como interação social (exemplo: gaiolas com 14 ratos), estímulos ao comportamento exploratório (exemplo: com brinquedos e túneis que podem ser rearranjados) e motor (exemplo: roda de correr). Estes objetos constituem-se em fatores estimuladores do sistema sensorial e motor (VAN PRAAG *et al.*,

2000). Nesse sentido, a estimulação cognitiva de camundongos mantidos em ambiente enriquecido durante a velhice produziu efeitos tão benéficos quanto à mesma estimulação feita ao longo de toda a vida. Além disso, a estimulação cognitiva tardia promoveu o aumento da densidade de receptores colinérgicos nicotínicos $\alpha 7$, aumento da enzima colina acetiltransferase e aumento da densidade de BDNF (BARALDI *et al.*, 2013). Com relação aos receptores $\alpha 7$, é válido ressaltar que os mesmos, localizados na região pós-sináptica, estão relacionados a uma rápida transmissão excitatória (DANI e BERTRAND, 2007).

Imergir em um ambiente enriquecido portanto resulta em uma série de atividade voluntárias, que modulam a capacidade cognitiva e aumentam a produção de neurotrofinas chaves para plasticidade sináptica (GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2008). Ainda, aumentam tanto a LTP, quanto a LTD. O fluxo sanguíneo cerebral também é influenciado pelo nível de atividade neuronal em resposta a estímulos, uma vez que neurônios em atividade precisam receber um aporte adequado de oxigênio e glicose (PUTNAM *et al.*, 2004; NISHIJIMA e SOYA, 2006). O tipo de atividade ou tarefa, e a forma como esta é realizada tem diferentes efeitos sobre o encéfalo (HOLSCHNEIDER *et al.*, 2007).

Uma tarefa pode ser definida por exigir uma grande quantidade de guia atencional ou não; ou pode ser definida por ser guiada interna ou externamente, o que sugere o recrutamento de diferentes circuitos motores (LEWIS *et al.*, 2007). Movimentos motores guiados internamente, ou seja, iniciados voluntariamente, apresentam um domínio do circuito núcleos da BTC, enquanto que movimentos guiados por pistas externas apresentam um domínio do circuito CbTC (LEWIS *et al.*, 2007). Estes circuitos parecem estar em equilíbrio. Durante o aprendizado inicial, os movimentos são mais guiados internamente, havendo predomínio do circuito BTC, e quando os movimentos vão se tornando mais automáticos e guiados externamente, a influência deste circuito diminui, havendo então predomínio do circuito CbTC (HOLSCHNEIDER *et al.*, 2007). A tarefa por exemplo de caminhar sobre uma escada horizontal tendo que controlar a passada para pisar apenas onde se encontra um degrau aumenta a atividade de neurônios do córtex motor (incluindo os de origem no trato piramidal) e do cerebelo (como as células de Purkinje e neurônios dos núcleos cerebelares) de gatos (ARMSTRONG e MARPLE-HORVAT, 1996).

2.5 Fator neurotrófico derivado do cérebro

Segundo BARALDI *et al.* (2013), o BDNF é distribuído pelo SNC e essencial para o desenvolvimento, diferenciação e sobrevivência dos neurônios (TAPIA-ARANCIBIA *et al.*, 2008). Além de aparecer em grande concentração no hipocampo, córtex cerebral e amígdala (MURER *et al.*, 2001), seus efeitos estão relacionados a vários processos nessas áreas, incluindo plasticidade sináptica, diferenciação e sobrevivência neuronal, neuroproteção, resiliência neuronal e recuperação contra vários danos celulares (HU e RUSSEK, 2008). Além disso, o BDNF sustenta a função colinérgica a longo prazo através de sua influência nos receptores colinérgicos $\alpha 7$, tanto no hipocampo como em neurônios parassimpáticos. Adicionalmente, está envolvido na regulação de receptores $\alpha 7$ no hipocampo e em neurônios parassimpáticos (MASSEY *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2006). Assim, é possível inferir que o aumento na funcionalidade do sistema colinérgico age como modulador da potenciação de longa duração e, conseqüentemente, da formação da memória de longa duração (BARALDI *et al.*, 2013).

Evidências emergentes indicam que os eventos associados ao balanço energético podem afetar a função sináptica e cognitiva (WU e PRIOR, 2005). A plasticidade neuronal e cognitiva depende do gerenciamento da energia celular e, portanto, é influenciada por experiências que afetam intrinsecamente o estado energético da célula, como a atividade física (LEE *et al.*, 2000; MATTSON *et al.*, 2004). A atividade física demonstrou aumentar a função cognitiva em seres humanos e animais (FORDYCE e WHNER, 1993; LAURIN *et al.*, 2001), tendo o BDNF como um dos principais mediadores do efeito do exercício sobre a plasticidade sináptica (GRIESBACH *et al.*, 2004; MOLTENI *et al.*, 2004; VAYNMAN, YING e GOMEZ-PINILLA, 2004; VAYNMAN, YING e GÓMEZ-PINILLA, 2004). Verificou-se que quando há a inibição de BDNF no hipocampo, o aumento esperado induzido pelo exercício na aprendizagem e na memória é bloqueado através da redução da expressão de moléculas envolvidas na plasticidade sináptica e cognição (VAYNMAN, YING e GÓMEZ-PINILLA, 2004).

O aumento do BDNF promove também um incremento da atividade mitocondrial (EL IDRISSE e TRENKNER, 1999). A importância do BDNF em impactar o metabolismo energético é observada em distúrbios do balanço

energético, como obesidade, insensibilidade à insulina e hiperglicemia. Os ratos com níveis reduzidos de BDNF possuem maior susceptibilidade para obesidade e hiperglicemia (KERNIE *et al.*, 2000; LYONS *et al.*, 1999). A administração de BDNF periférica ou central reduz o peso corporal, normaliza os níveis de glicose em roedores diabéticos (TONRA *et al.*, 1999) e aumenta a sensibilidade à insulina (PELLEYMOUNTER *ET AL.*, 1995; NAKAGAWA *ET AL.*, 2000).

Ainda, a literatura sugere que a plasticidade sináptica induzida pelo BDNF por ser afetada por alterações na potência de membrana mitocondrial, resultando em desequilíbrio no balanço energético. Particularmente, a proteína de desacoplamento 2 (UCP2), membro da superfamília das proteínas de desacoplamento localizado na membrana interna mitocondrial, pode apoiar esses mecanismos moleculares necessários para impactar a sinapse (ANDREWS *et al.*, 2005). A UCP2 está envolvida no vazamento de prótons de hidrogênio do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, desacoplando assim a oxidação do substrato da síntese de ATP (KLAUS *et al.*, 1991; VIDAL-PUIG *et al.*, 1997).

A UCP2 é abundantemente expressa no hipocampo (PARADIS *et al.*, 2003) e especificamente em populações neuronais seletivas envolvidas com a coordenação da homeostase e sujeitas a regulação neuronal e humoral maciça (HORVATH *et al.*, 1999). Assim, a capacidade de comportamentos, como a prática de atividade física e exercício físico, para influenciar a plasticidade neural pode estar na sua capacidade de acessar a função mitocondrial crítica para manter as demandas de energia celular e o metabolismo.

2.6 Exercício físico e atividade física relacionados à saúde

No início da década passada estudos apontavam que grande parcela da população brasileira não atinge as recomendações mínimas quanto à prática regular de atividade física (DIAS-DA-COSTA *et al.*, 2005), que se entende como qualquer movimento produzido pela musculatura esquelética que acarrete em um gasto energético maior que aquele observado durante repouso (CASPERSEN *et al.*, 1985). Atualmente, a prevalência de inatividade física ainda é elevada no Brasil e em vários outros países (HALLAL *et al.*, 2012). De acordo com a Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, realizada em 2014 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, mais de 100 milhões de brasileiros

com 15 anos ou mais não praticavam qualquer tipo de atividade física ou esporte, o que representava 62,1% da população brasileira (BRASIL, 2014).

Essa prevalência é preocupante tendo em vista que o comportamento sedentário induz uma série de adaptações fisiológicas crônicas negativas no corpo humano em todas as faixas etárias, como perda de força e massa muscular, diminuição da capacidade cardiorrespiratória, além de ter o risco aumentado para eventos cardiovasculares, alguns tipos de câncer, diabetes e outras desordens metabólicas (LEE *et al.*, 2012). Além disso, o processo de envelhecimento produz, de modo geral, prejuízo das capacidade funcional, o que aumenta ainda mais o comportamento sedentário em idosos. Desta forma, essa população apresenta diversas complicações referentes a escolha de um estilo de vida sedentário, como diminuição da autonomia e capacidade funcional, diminuição da massa muscular, podendo resultar em sarcopenia (HEPPLE, 2003). Esse processo degenerativo, em muito casos, impossibilita o indivíduo de executar atividades da vida diária, sendo uma das principais causas de perda de independência e declínio funcional em idosos. Além disso, é observado um declínio da memória e função cognitiva geral, decorrentes do aparecimento de DND, que resultam também no aumento da dependência funcional desses indivíduos (HOF e MORRISON, 2004).

Por outro lado, as adaptações fisiológicas crônicas positivas decorrentes da prática regular de exercício físico e atividade física geram um aumento na expressão de diversos genes, que estão ligados a uma melhora na funcionalidade do corpo humano de uma maneira geral. O exercício físico se caracteriza por ser uma forma de atividade física planejada e repetitiva que objetiva a manutenção ou a otimização do condicionamento físico por meio de adaptações fisiológicas (CASPERSEN *et al.*, 1985). Estudos em humanos mostraram claramente a diferença nas adaptações decorrentes de diferentes modelos de exercícios físicos, como o de alta intensidade (também chamado de anaeróbio e normalmente intermitente) e o intensidade moderada (também chamado de aeróbio e normalmente contínuo). O treinamento anaeróbio visa aumentar a resistência do organismo ao acúmulo de acidez (marcada pela concentração de lactato), sendo a glicólise anaeróbia a via metabólica predominante nesse tipo de exercício. O treinamento aeróbio, por outro lado, é caracterizado por aumentar a capacidade de produção de energia através da

biogênese mitocondrial no músculo esquelético, processo no qual determina o aumento no número e tamanho das mitocôndrias. Deste modo, este tipo de exercício físico aumenta a capacidade de captar, transportar e utilizar o oxigênio (BAAR, 2004). As distinções apontadas acima explicam a especificidade das adaptações ocorridas em resposta a cada tipo de treinamento e sua relevância na avaliação dos efeitos do exercício nos estudos científicos.

Mais recentemente, um crescente número de estudos têm relacionado o exercício físico com um melhor funcionamento do cérebro. Muitas evidências convergem para o conceito de que o exercício traz benefícios para a memória e o aprendizado, atrasa o declínio cognitivo relacionado com o envelhecimento e reduz o risco do desenvolvimento da depressão e de DND (COTMAN *et al.*, 2007; DESLANDES *et al.*, 2009). O BDNF tem sido especialmente estudado, pois está fortemente relacionado a uma melhora na plasticidade sináptica do hipocampo, região do cérebro ligada a memória e ao aprendizado (VAYNMAN, YING e GÓMEZ-PINILLA, 2004).

2.7 Plasticidade neuronal e exercício físico

A plasticidade neuronal ou plasticidade sináptica foi definida por Thoenen (THOENEN, 1995) como a capacidade dos neurônios de melhorar ou deprimir a eficácia sináptica através de mudanças bioquímicas ou morfológicas que se desenvolvem de maneira dinâmica. Dois modelos de plasticidade sináptica têm sido particularmente estudados: a LTP e a LTD. A LTP é rapidamente induzida e persistente, o que está diretamente ligado com grande capacidade, rápida aquisição e estabilidade da memória. Antagonicamente, a LTD é induzida por baixa frequência estimulatória. Ambas estão envolvidas em processos de fosforilação pós-sináptico e tráfego de receptores de glutamato (MALENKA, 2003).

Outro processo plástico, pelo qual o cérebro pode otimizar sua performance é a neurogênese, que ocorre essencialmente no bulbo olfatório e em uma área do hipocampo chamada giro denteado. Há uma interessante correlação entre fatores ou situações fisiológicas, que alteram a expressão de BDNF e modificam a neurogênese em ratos adultos. Habitar ambientes com estresse reduzido ou mesmo ausente, a prática de exercício físico, atividade física e cognitiva são capazes de aumentar a concentração de BDNF e TrkB no

hipocampo, bem como a neurogênese em ratos adultos (DING; YING; GÓMEZ-PINILLA, 2011; MIZUNO *et al.*, 2003; NEEPER *et al.*, 1996).

O BDNF está envolvido no processo de tradução da atividade do sinal em mudanças na plasticidade sináptica, ou seja, o processo no qual mudanças funcionais se transformam em mudanças estruturais. As espinhas dendríticas, minúsculas estruturas que formam sinapses com outros neurônios, são o local onde ocorrem essas mudanças estruturais, influenciando a atividade e a função neuronais. Foi demonstrado que o BDNF é necessário e suficiente para induzir mudanças estruturais de longa duração nessas estruturas. Além disso, o aumento das espinhas dendríticas pode ser bloqueado quando a síntese de BDNF é inibida (TANAKA *et al.*, 2008). Deste modo, parece que o BDNF se faz necessário para algumas formas de aprendizado mediadas no hipocampo, provavelmente através de mudanças estruturais. Estudos anteriores já demonstravam que a indução de LTP no hipocampo de ratos aumenta os níveis de RNA mensageiro de BDNF de maneira rápida e seletiva (PATTERSON *et al.*, 1992). Assim, camundongos sem o gene de BDNF têm a LTP comprometida (KORTE *et al.*, 1995) (Figura 9).

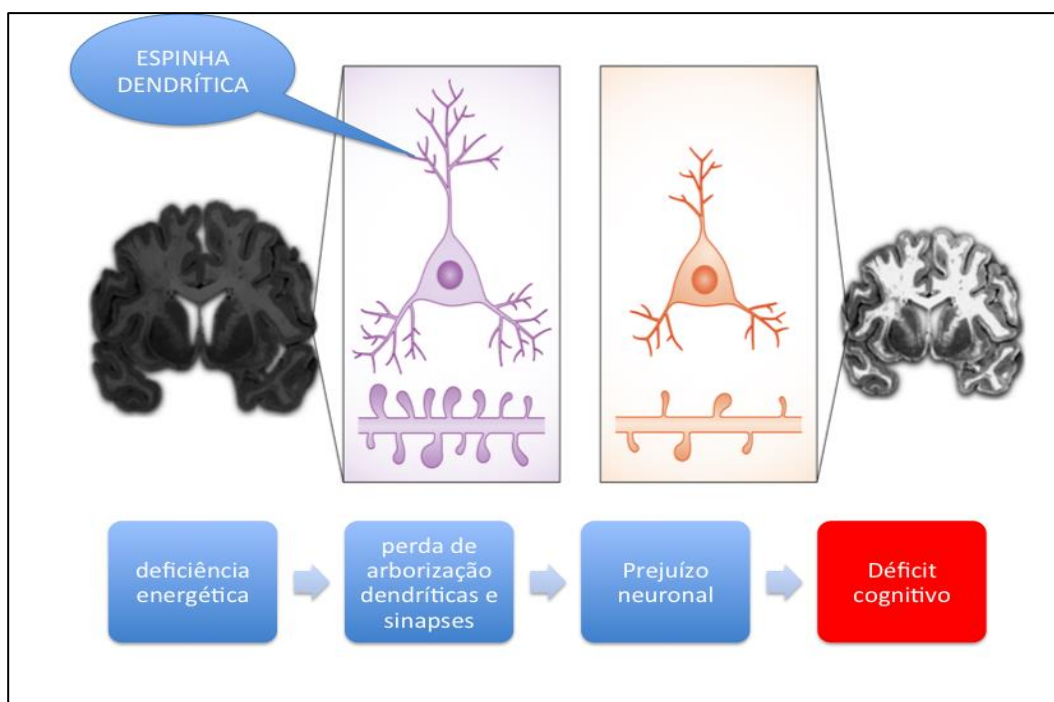


Figura 10. Declínio cognitivo relacionado à idade como resultado de mudanças neuroanatômicas impulsionadas pela diminuição do suprimento de energia <https://epiphanyasd.blogspot.com/2017/07/targeting-dendritic-spines-to-improve.html>.

A expressão de BDNF é positivamente regulada por glutamato, um aminoácido cujo receptor, N-Metil-D-Aspartato (NMDA) induz a LTP e causa uma rápida polimerização de actina na espinha dendrítica no hipocampo, quando estimulado (AICARDI *et al.*, 2004). Um estudo recente, mostrou que bloquear a ação de BDNF resulta em uma significativa redução na densidade da espinha dendrítica, associada ao aumento do seu tamanho e diminuição no comprimento da cabeça (KELLNER *et al.*, 2014). Essas mudanças estão associadas com a diminuição nos níveis de actina dentro das cabeças da espinha (KELLNER *et al.*, 2014). Adicionalmente, nos neurônios do hipocampo, o AMP cíclico modula positivamente a fosforilação de TrkB induzida por BDNF e a formação de espinhas dendríticas, regulando a sinalização e o tráfego de TrkB (JI *et al.*, 2005). Essas evidências mostram que o BDNF tem um papel importante na plasticidade de regiões do SNC, em especial o hipocampo. Essa propriedade depende de mudanças funcionais e morfológicas, como a fosforilação de proteínas e a reorganização do citoesqueleto de espinhas dendríticas.

A figura 11 ilustra a ligação do glutamato ao seu receptor NMDA pós-sináptico na membrana da espinha dendrítica, que juntamente com a indução de sinais elétricos pós-sináptico, geram atividade pré e pós sináptica e a consequente liberação de grandes quantidades de BDNF pelo neurônio pós-sináptico, ativando os receptores TrkB na espinha. Com isso, se inicia a síntese proteica local necessária para as mudanças estruturais na espinha, possivelmente relacionadas com a indução de LTP no hipocampo (MATSUMOTO *et al.*, 2008).

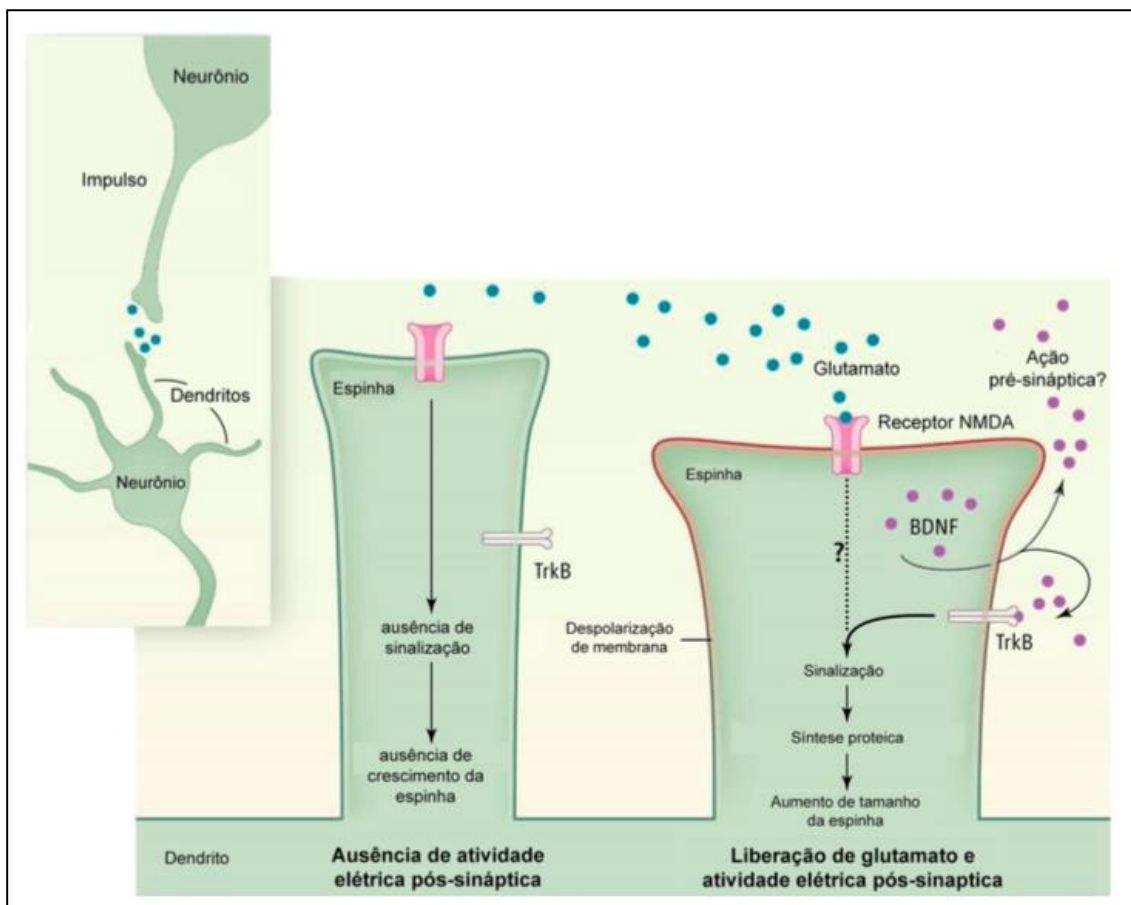


Figura 11: A ligação de glutamato ao seu receptor NMDA e as mudanças estruturais na espinha dendrítica induzidas por BDNF e TrkB. Adaptada de Matsumoto et al. (2008)

Rex e colaboradores (2007) mostraram que mudanças plásticas induzidas pelo envelhecimento podem ser revertidas pela indução endógena de BDNF, modulando positivamente os receptores AMPA, outro tipo de receptor de glutamato, no cérebro e restaurando a LTP em ratos de meia idade.

A perda de espinhas dendríticas prejudica a função cerebral em DND, afetando o processo normal de envelhecimento (SCHUMAN *et al.*, 2006). Considerando que o RNA mensageiro para BDNF e seu receptor TrkB estão localizados nessa região e que essas têm sua densidade significativamente reduzida com a idade, parece haver uma relação entre a expressão de RNA mensageiro para BDNF e TrkB e prejuízos nas conexões sinápticas com a idade (HOF e MORRISON, 2004). Em ratos com 18 meses de idade foi encontrada uma redução na expressão de BDNF associada com uma alterada inervação serotoninérgica e noradrenérgica, sendo o primeiro de forma acentuada no hipocampo, que se manifesta como uma diminuição na neurotransmissão basal (LUELLEN *et al.*, 2007).

A diminuição do volume e a perda de sinapses do hipocampo de ratos por consequência da idade, bem como um declínio na memória espacial foram correlacionados não somente com uma diminuição da expressão de BDNF, mas também de seu receptor (TrkB). Tapia-Arancibia *et al.* (TAPIA-ARANCIBIA *et al.*, 2008) e Arancibia *et al.* (ARANCIBIA *et al.*, 2008) notaram que durante o envelhecimento, ratos Sprague-Dawley e Wistar tendem a manter ou aumentar o conteúdo de BDNF no hipocampo, porém ocorre concomitante a diminuição nos níveis do receptor TrkB, resultando em uma menor ação do BDNF. Erickson e colaboradores (ERICKSON, K. I. *et al.*, 2011) constataram que alterações na concentração do BDNF medeia os prejuízos à memória oriundos da idade. Além disso, foi visto que indivíduos com níveis maiores de BDNF apresentaram maiores volumes de hipocampo nesse estudo, evidenciando o papel essencial dessa neurotrofina na proteção das memórias e na manutenção do volume do hipocampo. Além disso, os níveis reduzidos de BDNF encontrados no hipocampo de idosos (LOMMATZSCH *et al.*, 2005; ZIEGENHORN *et al.*, 2007) são um importante marcador independente e fidedigno de risco de mortalidade para essa população (KRABBE *et al.*, 2009).

Os estudos sobre os efeitos do exercício nos níveis de BDNF foram iniciados por Neeper *et al.* (NEEPER *et al.*, 1995) cujo trabalho demonstrou uma correlação positiva entre a distância percorrida em uma roda de corrida e a expressão de BDNF no hipocampo de ratos. Os autores concluíram que o exercício poderia aumentar a disponibilidade de BDNF para essas células, regulando positivamente sua expressão no hipocampo e deste modo aumentar a resistência do cérebro à degeneração. Esses achados foram confirmados por vários outros autores que mostraram que diferentes protocolos de exercício físico são capazes de aumentar a expressão de BDNF no cérebro de animais e em humanos (COTMAN e ENGESSER-CESAR, 2002; VAYNMAN, YING e GOMEZ PINILLA, 2004; VAYNMAN, YING e GÓMEZ PINILLA, 2004; COTMAN *et al.*, 2007; SZUHANY *et al.*, 2015; GRADARI *et al.*, 2016).

Uma interessante observação a respeito da mudança nos níveis de BDNF em ratos, durante o tempo de treinamento e no subsequente destreino foi publicado por Oliff *et al.* (1998). Como resultado, foi visto que o exercício voluntário diário em uma roda de corrida resultou em um aumento significativo nos níveis de BDNF após 14 dias e continuou aumentando até o final dos 90 dias

de treinamento. Porém, o principal achado foi a manutenção desses níveis, acima dos níveis encontrados em ratos sedentários, até sete dias após o término do treinamento diário. Os autores também constataram que o mesmo tipo de exercício executado em dias alternados é capaz de aumentar significativamente os níveis de BDNF no hipocampo de ratos, porém a magnitude desse aumento é menor e os níveis decaem mais rápido quando comparado ao treinamento diário. Isso mostra que o exercício voluntário é capaz de regular positivamente os níveis de BDNF no cérebro, mas o mais benéfico parece ser o treinamento diário executado por alguns meses (BERCHTOLD *et al.*, 2005).

Groves-Chapman *et al.* (2011) não encontraram diferença entre a distância percorrida e a resposta nos níveis de RNA mensageiro de BDNF ao comparar ratos Sprague–Dawley com alta capacidade de correr com ratos com baixa capacidade de correr. Ambas as raças apresentaram um aumento significativo nos níveis de RNA mensageiro de BDNF após três semanas, sem que houvesse diferença entre os grupos ou a magnitude da resposta. Os resultados indicaram que a expressão de BDNF aumenta pelo acesso ilimitado à roda de corrida, mas não depende da distância percorrida (GROVES-CHAPMAN *et al.*, 2011) .

Visando comparar as respostas na expressão gênica de BDNF entre o exercício forçado e o exercício voluntário, Alomari *et al.* (ALOMARI *et al.*, 2013) dividiram ratos em dois grupos distintos e os submeteram a natação forçada ou exercício voluntário em esteira. Ambos os grupos tiveram um aumento nos níveis de BDNF no hipocampo, além de uma melhora no aprendizado espacial. Os autores concluíram que, embora o exercício forçado esteja associado com níveis altos de estresse, ele não foi uma barreira suficiente para que a memória e o aprendizado e a expressão de BDNF aumentassem após o treinamento. Apesar disso, o aumento na expressão de BDNF no hipocampo de ratos expostos ao exercício voluntário foi significativamente maior, comparada a observada em ratos submetidos a níveis altos de estresse, ao executar um exercício forçado (ALOMARI *et al.*, 2013).

O estresse pode causar a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, causando um aumento excessivo nos níveis de glicocorticoides, associados à depressão e regulação negativa da expressão de BDNF no hipocampo. Estudos têm mostrado que o estresse por imobilização causa uma

redução na expressão de BDNF no hipocampo de ratos e um aumento nos níveis de corticosterona, hormônio induzido pelo estresse (NOOSHINFAR *et al.*, 2011). Fang *et al.* apresentaram a primeira evidência na literatura científica de que o exercício forçado em esteira é capaz de aumentar os níveis de moléculas envolvidas na sinalização de BDNF/TrkB no hipocampo de ratos submetidos ao estresse por imobilização. Considerando que a sinalização de BDNF/TrkB está envolvida na promoção da plasticidade sináptica e neuroproteção, que são respostas esperadas pela ação de alguns antidepressivos, o exercício físico se mostrou importante para a prevenção e tratamento da depressão (FANG *et al.*, 2013).

Além disso, a prática regular de exercício físico atua como protetora do SNC aumentando a resistência a lesões (COTMAN e ENGESSER-CESAR, 2002; DING *et al.*, 2002), facilitando a recuperação funcional pós-lesão (MATTSON, 2000; EDGERTON *et al.*, 2004), e minimizando o dano por lesão por falta de glicose e oxigênio (CECHETTI *et al.*, 2007). In vivo, o exercício reduz o dano neuronal em gerbos submetidos a isquemia (STUMMER *et al.*, 1994) e apresenta redução do volume do infarto em ratos treinados submetidos a isquemia focal (WANG *et al.*, 2001).

Da mesma forma, as adaptações que o exercício induz no sistema nervoso têm implicações na prevenção e tratamento de obesidade, câncer, depressão, declínio cognitivo associado ao envelhecimento e com distúrbios neurológicos como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, acidente vascular isquêmico e lesões medulares ou encefálicas (SUTOO e AKIYAMA, 2003; DISHMAN *et al.*, 2006). Em um modelo experimental da doença de Parkinson, induzido pela injeção intrastriatal de 6-hidroxidopamina, foi observado que os animais submetidos a duas semanas de exercício em esteira (30 min/dia) apresentavam redução significativa da assimetria rotacional (observada após injeção de apomorfina) e maior sobrevivência de neurônios dopaminérgicos na substância cinzenta (e de suas fibras que se projetam ao estriado) em relação aos controles sedentários (YOON *et al.*, 2007). Já em humanos (CHEN *et al.*, 2005), um estudo prospectivo com pacientes apresentando estágios iniciais da doença de Parkinson mostrou que 24 sessões de exercício em esteira, além de normalizarem a excitabilidade córtico-motora, provocaram melhora na performance funcional, aumentando a velocidade da marcha, alargando a

passada, aumentando a excursão dos movimentos do quadril e tornozelo e melhorando a distribuição de peso durante tarefas senta-levanta (FISHER *et al.*, 2008).

Em um modelo experimental da doença de Alzheimer induzida pela injeção intracerebroventricular (ICV) de estreptozotocina (STZ), observou-se que o exercício em esteira realizado após a injeção preveniu parcialmente a redução da memória de longo prazo induzida pelo modelo e em algumas regiões do hipocampo preveniu parcialmente a redução do número de células positivas para c-Fos (JEE *et al.*, 2008). O exercício após a indução do modelo também se mostrou capaz de evitar déficits cognitivos espaciais, estresse oxidativo e a redução da proteína glial S100 β no líquido cérebroespinal (CSF), além de aumentar a expressão de GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e glutatona na região CA1 (RODRIGUES *et al.*, 2010). Atividade física em roda de corrida também melhorou o desempenho cognitivo de modelos transgênicos de doença de Alzheimer (NICHOL *et al.*, 2007). A falta de exercício por sua vez parece estar associada a níveis mais altos de tau, tau fosforilada e a tendência a menores níveis de A β 42 em adultos cognitivamente normais (LIANG *et al.*, 2010).

Há também estudos clínicos, com doenças como a epilepsia, que mostram um efeito benéfico do exercício na frequência e na severidade das crises epiléticas (DENIO *et al.*, 1989; ERIKSEN *et al.*, 1994), sugerindo que o exercício eleva o limiar das crises e pode desempenhar um papel protetor também nestes pacientes (GÖTZE *et al.*, 1967; LIVINGSTON *et al.*, 1978). Em modelos animais foi observada uma redução do número de crises em animais submetidos a treinamento físico (ARIDA *et al.*, 2007). Estudos eletrofisiológicos mostraram uma redução da hiperresponsividade da região CA1 do hipocampo e aumento da magnitude da LTP no hipocampo em ratos epiléticos treinados (ARIDA *et al.*, 2007). Foi observado um número maior de células marcadas para parvalbumina tanto em animais controles que corriam, quanto em animais epiléticos que corriam, quando comparados aos seus respectivos controles sedentários. Parvalbumina é um marcador sensível de células hipocâmpais, particularmente de uma população de interneurônios inibitórios (FREUND e BUZSÁKI, 1996). Este aumento de células marcadas para parvalbumina, contudo, foi observado nos animais epiléticos apenas para os que realizaram protocolos agudos de corrida (tanto voluntária quanto forçada), enquanto que os

controles que corriam apresentaram aumentos tanto para protocolos agudos (10 dias) quanto crônicos (45 dias) (ARIDA *et al.*, 2007).

Na lesão medular, o exercício pode ser utilizado como facilitador da recuperação funcional. Foi observado que, após quatro semanas de exercício em esteira com suporte gravitacional, camundongos com hemissecção torácica baixa apresentaram melhoras significativas do uso do membro parético. Estes animais apresentaram menor atrofia muscular, aumento da regeneração axonal brotamento colateral próximo à lesão com manutenção de marcadores sinápticos nos neurônios motores do corno ventral da medula. Acredita-se que estas melhoras se devem, pelo menos em parte, ao aumento da atividade neuronal acima da lesão (GOLDSHMIT *et al.*, 2008). Outros estudos demonstraram também que o uso do membro comprometido (por acidente vascular ou doença de Parkinson) pode alterar a atividade do encéfalo pela reorganização de aferências, ativando áreas alternativas do encéfalo (COHEN *et al.*, 2003; LIEPERT *et al.*, 2004; RAMANATHAN *et al.*, 2006).

Acreditava-se que doenças neurológicas, como Alzheimer e Parkinson, e lesões como acidente vascular, resultavam na perda permanente de neurônios sem qualquer possibilidade de regeneração celular (VAN PRAAG, CHRISTIE, *et al.*, 1999). Hoje já se sabe que algumas regiões do encéfalo, como a zona subventricular dos ventrículos laterais e a zona subgranular do giro denteado do hipocampo, são capazes de gerar neurônios novos por toda a vida adulta de mamíferos (AZIZI e VENDRAME, 2007; ZHAO *et al.*, 2008). Processos como a neurogênese encontram-se aumentados após exercício físico, assim como a complexidade dendrítica e a sinaptogênese no giro denteado (VAN PRAAG, CHRISTIE, *et al.*, 1999; VAN PRAAG *et al.*, 2002; REDILA e CHRISTIE, 2006; REDILA *et al.*, 2006). Resumidamente, o exercício físico pode afetar a neuroquímica hipocampal (FORDYCE e WEHNER, 1993), a atividade neuronal (Vissing *et al.*, 1996), a expressão de fatores tróficos (NEEPER *et al.*, 1996; GÓMEZ-PINILLA *et al.*, 1997) e a proliferação e sobrevivência de células granulares (VAN PRAAG, KEMPERMANN, *et al.*, 1999). Foi observado que o exercício voluntário por duas semanas aumentou o número de células novas no hipocampo de ratas submetidas a ovariectomia, portanto, privadas de estrógeno, o que sugere que o exercício também pode beneficiar a função cerebral de mulheres no climatério (JIN *et al.*, 2008).

O exercício atenua respostas neurais ao estresse, possivelmente contribuindo para a redução de patologias clínicas como hipertensão, insuficiência cardíaca, estresse oxidativo e imunodepressão (DISHMAN *et al.*, 2006). A associação do exercício físico ao menor risco de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico (HAHEIM *et al.*, 1993; SALONEN *et al.*, 1982) se deve em parte ao fato de que exercícios aeróbicos regulares atenuam o espessamento da camada íntima média, o enrijecimento das artérias e a disfunção endotelial, e por outro lado, parecem aumentar o número e a função de células progenitoras endoteliais (JENKINS *et al.*, 2010). Na diabetes tipo II, a plasticidade pré-sináptica parece estar afetada no giro denteado de ratos, porém exercícios em esteira de intensidade moderada por 12 semanas previnem este efeito (REISI *et al.*, 2008). Portanto, o exercício físico é uma valiosa abordagem terapêutica para prevenir DND relacionadas com o envelhecimento, além de doenças que podem ocorrer durante toda a vida adulta, como doenças cardiovasculares, câncer de mama e cólon, obesidade, depressão e ansiedade (HEALTH e SERVICES, 2000).

Uma das modalidades de exercício físico mais utilizadas para ratos é a corrida. Para alguns autores, a corrida forçada (em esteira, por exemplo) causa estresse físico e psicológico, diferente da corrida voluntária (SHERWIN, 1998). Entretanto, o exercício em si é considerado uma forma de estresse, pois desafia a homeostase e se torna benéfico quando realizado corretamente (MASTORAKOS *et al.*, 2005; ROZMAN E DOULL, 2003). Foi observado que após serem removidos de suas gaiolas com rodas de corrida, quando testados em labirinto em cruz elevado, ratos apresentavam mais comportamentos indicativos de ansiedade (GRACE *et al.*, 2009).

Exercício em esteira é um componente-chave para muitos programas de reabilitação neurológica (HOLSCHNEIDER *et al.*, 2007). Sendo o exercício em esteira uma tarefa guiada externamente, alguns autores hipotetizaram que ela provoque alterações no circuito CbTC (HOLSCHNEIDER *et al.*, 2007). Treinamento diário em esteira também pode promover fortalecimento das sinapses pela ativação repetida da transmissão neuronal glutamatérgica (CHANG *et al.*, 2009). No estudo de Ding *et al.* (2002) foram comparados os efeitos de protocolos de exercício em Rota-rod - teste de desempenho de realizado em uma haste rotativa com atividade de motor e é utilizado para

mensurar parâmetros como condicionamento cardiorrespiratório - e em esteira convencional e foi observado que ambos aumentaram a imunorreatividade para sinaptofisina em núcleos do lado direito do tálamo de ratos, porém apenas o Rota-rod promoveu a melhora da performance motora em uma série de testes motores (DING *et al.*, 2002).

O exercício em esteira também promove efeito neuroprotetor. Foi observado por Sim *et al.* (2005) que o exercício em esteira uma vez por dia por 30 min/dia durante 10 dias promoveu melhoras da memória e reduziu a morte neuronal provocada por isquemia no giro denteado de gerbos (SIM *et al.*, 2005). Também foi evidenciado que o exercício em esteira protege contra agentes excitotóxicos, prevenindo dano e perda neuronal (CARRO *et al.*, 2001).

É importante ressaltar, portanto, 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, moderada ou intensa), com a duração (tempo por sessão) e com a frequência com que é realizado (por exemplo, diário, três vezes por semana, entre outras) (NARATH *et al.*, 2001). No ambiente experimental, o protocolo de treinamento forçado consiste em sessões de corrida em esteira ergométrica ou de nado forçado (RADAK *et al.*, 2001), enquanto o livre acesso a uma roda de corrida é considerado uma forma de atividade física voluntária (RUSSELL *et al.*, 1987). Estudos anteriores têm demonstrado diferentes respostas, dependendo do protocolo de treinamento utilizado (ANG e GOMEZ-PINILLA, 2007). Assim, 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).

2.7.1 Intensidade do Exercício Físico

Quanto a intensidade do esforço, o exercício físico pode ser classificado como leve, moderado ou intenso, de acordo o consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}), medida 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, a medida do VO_{2max} é um instrumento bastante utilizado

para a prescrição e orientação de programas de exercício físico. Exercícios leves correspondem a intensidades que variam entre 30 a 49% do VO₂max, exercícios moderados variam entre 50 a 74%, enquanto que exercícios realizados acima de 75% do VO₂max são considerados intensos (MEDICINE, 2013). Embora a intensidade do esforço seja determinada de acordo com objetivo de cada estudo, cabe destacar que o exercício moderado tem demonstrado uma melhor ação neuroprotetora quando comparado àqueles de maior e menor intensidade (CECHETTI *et al.*, 2008).

Há autores que afirmam que o efeito protetor do exercício físico forma uma curva em “U” invertido em relação à intensidade do exercício: intensidade baixa seria insuficiente para acumular efeitos crônicos positivos; já a intensidade moderada protegeria e a intensidade alta aumentaria a vulnerabilidade (CECHETTI *et al.*, 2007). No entanto, essa diretriz tem sido mostrada como incorreta, pois muitos fatores devem ser considerados ao se avaliar o real efeito protetor das diferentes intensidades do exercício, as quais podem variar em função do órgão alvo do estudo (AFZALPOUR *et al.*, 2015; DOSTES *et al.*, 2016).

Ao avaliar a indução de c-fos (marcador de ativação neuronal) e a expressão de BDNF no hipocampo de ratos *Wistar* adultos como resposta ao exercício forçado agudo (sete dias de corrida) de diferentes intensidades, Soya *et al.* (2007) observaram que o RNAm para c-fos estava aumentado mesmo nos ratos submetidos a corrida de baixa intensidade (30min/dia a 15m/min). Contudo, os aumentos do RNAm e da proteína BDNF foram vistos apenas nos ratos que correram com intensidade baixa. A corrida com intensidade moderada (25m/min), que provocou elevação do lactato sanguíneo e dos níveis de corticosterona, induziu a redução do RNAm para BDNF (SOYA, MUKAI, *et al.*, 2007). Com este estudo, os autores mostraram que pode-se obter mais benefícios para a função hipocampal com exercícios agudos de baixa intensidade (minimamente estressantes) quando comparados com exercícios mais extenuantes (SOYA, MUKAI, *et al.*, 2007). Esta hipótese é confirmada pelos achados de Lou *et al.* (2008) os quais demonstraram o aumento da expressão do RNAm de BDNF em ratos de cinco semanas de idade apenas no grupo que realizou exercícios em esteira de baixa intensidade.

A corrida aumenta a demanda metabólica e com maiores velocidades pode-se ultrapassar o limiar de lactato (ponto a partir do qual há desequilíbrio

entre a produção e o consumo de lactato, ocorrendo o acúmulo do metabólito no sangue. Esse acúmulo marca a incapacidade do sistema energético aeróbio de sustentar a oferta de oxigênio necessária para atender a demanda energética muscular esquelética, obrigando o músculo a buscar energia alternativa na fonte anaeróbia glicolítica) (KOYAL e BEAVER, 1973; DUVILLARD, 2001). Exercícios que ultrapassam o limiar de lactato ativam o sistema hormonal e o sistema nervoso simpático, inclusive a resposta ao estresse (GALBO, 1992). Um marco do estresse no exercício é o limiar de lactato acima do qual o nível de ACTH (hormônio adenocorticotrófico) no plasma se eleva (FARRELL *et al.*, 1983), sendo a secreção de ACTH um indicativo de estresse (PACAK, 2000). Áreas específicas do hipotálamo parecem estar envolvidas na resposta ao estresse durante o exercício (GALBO, 1992).

Foi observado por Soya *et al.* (2007) que durante a corrida realizada acima do limiar de lactato (supra-LL: 25m/min), o nível de ACTH aumentou significativamente. A corrida abaixo do limiar de lactato (sub-LL: 15m/min), no entanto, apresentou níveis de ACTH similares aos níveis basais. A concentração plasmática de adrenalina aumentou apenas com intensidade de corrida supra-LL, mostrando sensibilidade relativa entre a ativação dos eixos hipotalâmico-pituitário-adrenal (HPA) e hipotalâmico-simpato-adrenal (HSA) e o estresse provocado pela corrida. O aumento de glicose plasmática com a corrida supra-LL é consistente com o aumento de adrenalina pelo eixo HSA que resulta na mobilização de estoques hepáticos de glicogênio (maior demanda metabólica) (SOYA, MUKAI, *et al.*, 2007).

No hipotálamo destes animais, a marcação com c-fos mostrou um número significativamente maior de neurônios marcados no grupo de animais que realizou 30 minutos de corrida com intensidade supra-LL em comparação com o grupo controle e o grupo sub-LL. A corrida com intensidade sub-LL, por sua vez, não provocou ativação de c-fos em região alguma do hipotálamo (SOYA *et al.*, 2007). Neste modelo de corrida com mínimo de estresse pôde-se observar também uma ativação rápida do FSC (NISHIJIMA e SOYA, 2006).

Intensidades moderadas de exercício também têm mostrado um efeito protetor quando analisado o hipocampo de ratos da linhagem *Wistar*. Foi observada uma redução da liberação de LDH (lactato desidrogenase) causada pela privação de oxigênio e glicose em partes de hipocampo ratos que haviam

sido submetidos a um protocolo de exercício de intensidade moderada (duas semanas, 20min/dia), enquanto que intensidades mais altas (duas semanas, 60min/dia) exacerbavam os danos cerebrais (SCOPEL *et al.*, 2006). A maioria dos modelos experimentais de exercício em animais utilizou programas diários, porém humanos raramente se exercitam com esta frequência. Humanos geralmente se exercitam esporadicamente, o que representa níveis modestos de atividade física (FOLSOM *et al.*, 2000).

2.7.2 Duração do Protocolo de Exercício Físico

A determinação da duração de um programa de exercício nos estudos que determinaram seu potencial terapêutico é uma dúvida que persiste. Em seu trabalho de 2002, Molteni *et al.* demonstraram que, para alguns parâmetros, os exercícios agudos geravam maiores alterações que exercícios crônicos (MOLTENI *et al.*, 2004).

Foi observado que utilizar a roda de corrida livre por períodos prolongados (24 dias) reduziu a proliferação de células progenitoras hipocâmpais em ratas espontaneamente hipertensas à metade dos valores encontrados para os controles que não correram. Em contrapartida, corrida por períodos mais curtos (nove dias) provocaram um aumento da proliferação de até 500% nos valores encontrados nos controles (NAYLOR *et al.*, 2005). Corrida por períodos prolongados aumentou a resposta do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal com hipertrofia da glândula adrenal (65%) e aumentou os níveis plasmáticos de corticosterona, além de reduzir o peso do timo em aproximadamente 26%. A involução do timo ocorreu quando os níveis de corticosterona foram elevados cronicamente, portanto indicando que esse protocolo prolongado induziu resposta relacionada ao estresse. Estas respostas relacionadas ao estresse não foram observadas nos ratos que correram por períodos mais curtos (NAYLOR *et al.*, 2005).

Contudo, os efeitos negativos da corrida prolongada foram prevenidos pela restrição da distância percorrida por dia (NAYLOR *et al.*, 2005). A depender da linhagem de rato que foi estudada, muitas vezes esta restrição se tornou necessária. Fêmeas SHR, por exemplo, chegaram a correr até 23 km/dia em rodas de corrida após três semanas, enquanto que machos SHR correram cerca de 9 km/dia. Machos Wistar e Sprague- Dawley, contudo, correram apenas cerca

de 3 km/dia após três semanas (JONSDOTTIR e HOFFMANN, 2000; TONG *et al.*, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 2003).

2.8 Exercício físico, atividade física e memória

Dados de estudos epidemiológicos demonstraram que a atividade física esteve associada com a melhora da função cognitiva em indivíduos envelhecidos (AHLSSKOG *et al.*, 2011) e pode estar correlacionada com alterações estruturais no cérebro (ERICKSON *et al.*, 2009). Inclusive, Raz e colaboradores (2005) sugeriram que a prática regular de atividade física na fase adulta pode compensar o declínio cognitivo que ocorre na idade adulta avançada (RAZ *et al.*, 2005).

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 facilitou a aquisição e a retenção da memória em várias tarefas dependentes do hipocampo em animais jovens e envelhecidos, as quais incluíram 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 oito semanas preveniu o declínio da memória de reconhecimento em ratos *Wistar* de meia-idade (14-16 meses de idade). Além disso, Cechetti e colaboradores (2012) mostraram que o exercício de corrida em esteira realizado três 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 esteve 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 12). 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. Todavia, o exercício extenuante aumenta o estresse oxidativo e o risco de doenças. Ainda, 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 (PINGITORE *et al.*, 2015).

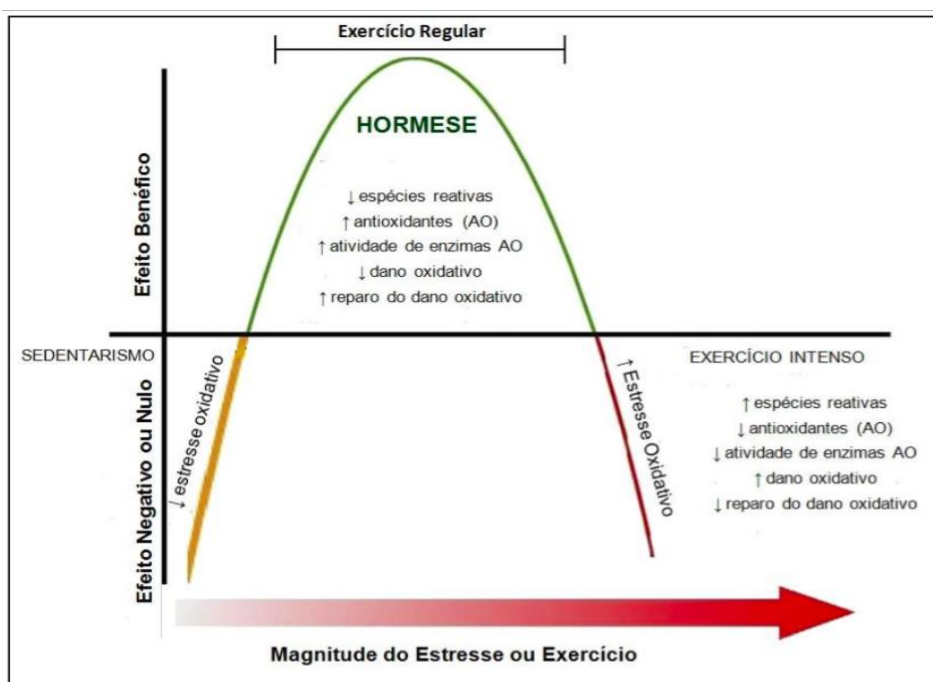


Figura 12. Hormese e exercício. Adaptado de Pingitore *et al.* (2015).

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). As neurotrofinas regulam várias funções neuronais incluindo proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação.

Evidências demonstraram que a expressão de NT-3 esteve 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 esteve 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 humanos jovens e idosos 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 têm 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 reforçaram a ideia de que o BDNF foi essencial para a função hipocampal, para a plasticidade e para o aprendizado (KUIPERS e BRAMHAM, 2006). Estudos em roedores demonstraram que o exercício aumentou 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)(PINGITORE *et al.*, 2015). Assim como o BDNF, a expressão do gene do IGF-1 é aumentada nos neurônios hipocampus em resposta ao exercício, permanecendo elevada mesmo após vários dias do seu término (PINGITORE *et al.*, 2015). 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 (PINGITORE *et al.*, 2015). De acordo com a Figura 13a, 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. Na figura 13b, 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.

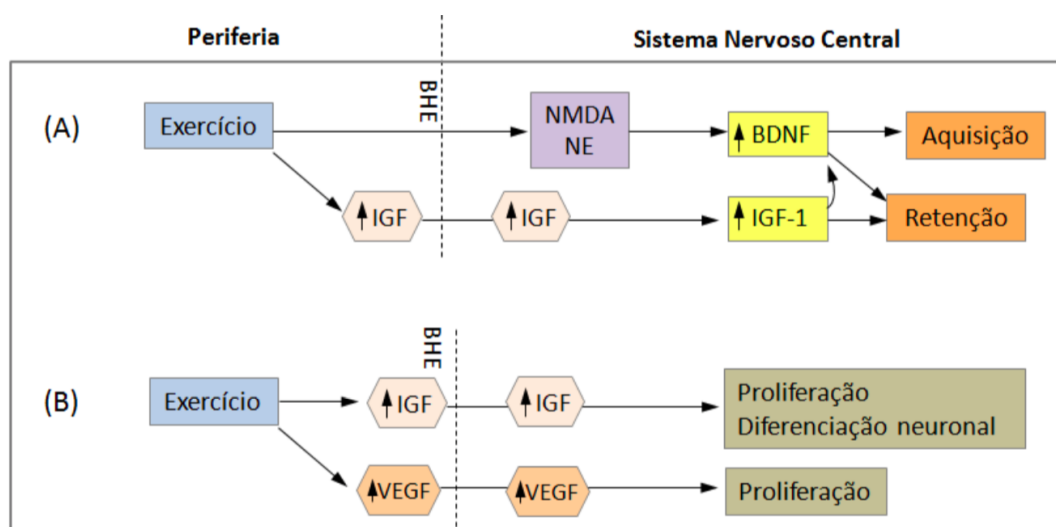


Figura 13. Efeito do exercício sobre o aprendizado e a memória através da cascata de fatores de crescimento. BHE: barreira hematoencefálica; IGF: fator de crescimento semelhante a insulina; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; NE: sistema noradrenérgico. Adaptado e traduzido 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 micróglia (CARRO *et al.*, 2000). No estudo realizado por Trejo e colaboradores (2001) foi observado que a liberação periférica de IGF-1 foi um dos fatores responsável por induzir a proliferação celular no giro denteado, pois a administração crônica do anticorpo anti-IGF-1 preveniu os efeitos positivos do exercício de corrida em esteira em ratos *Wistar* machos 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 foi 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 foi 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, estando 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⁺,K⁺-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 determinar as possíveis correlações com o desempenho dos animais nas tarefas de aprendizado e memória.

3. Materiais e métodos

3.1. Delineamento

Trata-se de estudo experimental de modelo pré-clínico.

3.2. Animais

Para a realização deste estudo serão utilizados 80 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 adultas (60 dias e pesando aproximadamente 30g no começo do experimento), fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Pelotas. Para o cálculo do tamanho amostral foi considerado um poder de 90% e alfa de 1% para desfecho em BDNF, H₂O₂, TNF- α e GDNF (ALZALPOUR *et al.*, 2015). Assim, serão utilizadas 16 ratas por grupo, visto que o cálculo para o desfecho em H₂O₂ resultou no maior número de animais por grupo.

Apenas ratas serão utilizadas devido a maior prevalência e gravidade de DND como DA e esclerose múltipla em mulheres (CARTER *et al.*, 2012; ZAGNI *et al.*, 2016). Além disso, a maioria das pesquisas com envolvendo exercício físico e modelos de neurodegeneração têm usado camundongos ou ratos machos, tornando-se necessário maior esclarecimento sobre os processos fisiológicos envolvidos entre os diferentes protocolos e parâmetros cerebrais em fêmeas. Os animais serão mantidos em condições experimentais controladas, à temperatura ambiente entre 24-27°C, água e comida “ad libitum”. Os sujeitos serão distribuídos em gaiolas coletivas (4 camundongos por gaiola). Todavia, os animais do grupo corrida voluntária ficarão dispostos em gaiolas individuais, de forma a evitar o domínio de um animal sobre a roda de corrida. Ainda, todos animais estarão sobre o ciclo claro/escuro de 12h, iniciando às 7 horas da manhã, durante todo o período do estudo. Os animais serão mantidos no Biotério Central da UFPEL.

3.3 Randomização e protocolo de treinamento

Os animais serão aleatoriamente divididos em um grupo controle e quatro grupos experimentais (n=16 ratos em cada grupo): C (sedentários - Controle); I (treinamento intermitente de alta intensidade - TIAI); II (treinamento aeróbio de intensidade moderada - TACIM); III (treinamento resistido – TR) e grupo IV (corrida voluntária - WR).

O protocolo utilizado no grupo TR será a modificação daquele realizado por Hornberger e colaboradores (HORNBERGER JR e FARRAR, 2004), e terá a duração de seis semanas, com três sessões de treinamento por semana (segunda, quarta e sexta feira). Os camundongos serão familiarizados por três dias (segunda, quarta e sexta feira) com uma escada customizada medindo 90 cm de altura, 15 cm de largura e com 2 cm entre os degraus, sendo posicionada a uma inclinação de 85°. No primeiro dia de familiarização, os animais subirão a escada sem nenhuma carga adicional ao peso deles. Nos próximos dois dias, uma carga correspondente a 50% do peso corporal de cada animal será fixada na parte proximal da cauda do animal, por meio de fita adesiva dupla face ou velcro. Após esse período, os animais iniciarão o protocolo de treinamento, como mostrado no quadro 1. Na primeira sessão (segunda feira), os animais subirão a escada com uma carga correspondente a 75% do seu peso corporal. Uma vez que o animal tenha escalado com sucesso até o topo da escada, a carga será aumentada em 30g e a tentativa será repetida. Esse processo será repetido até que o animal não consiga chegar ao topo da escada. A maior carga com a qual o animal conseguiu escalar a escada será considerada como a sua carga máxima para aquela sessão. As cargas para as próximas sessões serão baseadas na carga máxima da sessão precedente.

As próximas sessões respeitarão o seguinte protocolo: serão compostas por nove tentativas, sendo que durante as três primeiras, cargas referente a 50, 75 e 90% da carga máxima anterior serão utilizadas. Após as três primeiras tentativas, será adicionada 30g até que seja estabelecida uma nova carga máxima. Ao atingir essa marca, o animal terá três tentativas para escalar a escada com a nova carga máxima. Haverá um período de 90 segundos entre as tentativas, onde o animal será colocado em uma caixa que estará localizada no topo da escada (30 cm de comprimento x 15 cm de largura x 11 cm de altura). É importante salientar que os animais não serão motivados ou punidos em nenhum momento durante as tentativas.

Os grupos TACIM e TIAI serão familiarizados com a corrida na esteira motorizada digital para camundongos (Bonther®, São Paulo) durante cinco dias. A familiarização para estes grupos ocorrerá de segunda à sexta feira, no turno da manhã, entre 8h e 11h. Segundo o estudo de Schefer e Talan (SCHEFER e TALAN, 1996), camundongos adultos sedentários atingem 100% do seu

consumo máximo de oxigênio em esteira a uma velocidade próxima à 25m/min. Assim, a esteira terá a sua velocidade ajustada em 10 metros/minutos e os animais irão correr nessa velocidade por 10 minutos por dia. Os animais serão motivadas a correr via choque elétrico posicionado na parte final da esteira. A carga do choque será ajustada em 1,0 mA.

Após o período de familiarização, os animais realizarão o protocolo de treinamento cinco dias por semana (segunda à sexta), no turno da manhã, entre 8h e 12h. Em todas as sessões, os animais farão aquecimento e volta-a-calma de um minuto a 16 metros/minuto, velocidade que corresponde a 64% do consumo máximo de oxigênio. Após o aquecimento, os grupos iniciarão o protocolo abaixo (Quadro 1). O grupo TACIM iniciará com uma velocidade de 10m/min, para garantir que a intensidade seja moderada (Schefer & Talan, 1996), durante 60 minutos, onde a cada semana a velocidade da esteira será aumentada em um metro por minuto.

O grupo TIAI iniciará o protocolo de treinamento realizando dois *sprints* com duração de três minutos a 25 metros por minuto, velocidade referente a 100% da velocidade máxima (SCHEFER e TALAN, 1996). Na sessão seguinte, os animais realizarão três *sprints* com duração de 30 segundos a 25 m/min a 100% de sua velocidade máxima. O protocolo das sessões seguintes segue de acordo com o quadro 1.

Semana	Dia	TACIM	TIAI	TR
1	1	20'@17.5 m/min	2x(3'@25m/min:1'@17m/min)	1 tentativa com 75% do PC + determinar NCM
	2	22'@17.5 m/min	3x(30"@25m/min:1'@17m/min)	
	3	24'@17.5 m/min	2x(3'@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
	4	26'@17.5 m/min	5x(30"@25m/min:1'@17m/min)	
	5	28'@17.5 m/min	2x(3'@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM

				+ 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
2	1	30'@17.5 m/min	7x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
	2	32'@17.5 m/min	3x(3'@25m/min:1'@17m/min)	
	3	34'@17.5 m/min	9x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
	4	36'@17.5 m/min	3x(3'@25m/min:1'@17m/min)	
	5	38'@17.5 m/min	11x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
3	1	40'@17.5 m/min	3x(3'@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
	2	42'@17.5 m/min	13x(30"@25m/min:1'@17m/min)	
	3	44'@17.5 m/min	4x(3'@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
	4	46'@17.5 m/min	15x(30"@25m/min:1'@17m/min)	
	5	48'@17.5 m/min	4x(3'@25m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo

4	1	50'@17.5 m/min	17x(30"@25m/min: 1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
	2	52'@17.5 m/min	4x(3'@ 25m/min)	
	3	54'@17.5 m/min	19x(30"@25m/min: 1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
	4	56'@17.5 m/min	5x(3'@ 25m/min:1'@17m/m in)	
	5	58'@17.5 m/min	21x(30"@25m/min: 1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
5	1	60'@17.5 m/min	5x(3'@ 25m/min:1'@17m/m in)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
	2	60'@17.5 m/min	23x(30"@25m/min: 1'@17m/min)	
	3	60'@17.5 m/min	5x(3'@ 25m/min:1'@17m/m in)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
	4	60'@17.5 m/min	25x(30"@25m/min: 1'@17m/min)	
	5	60'@17.5 m/min	6x(3'@ 25m/min:1'@17m/m in)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
6	1	60'@17.5 m/min	27x(30"@25m/min: 1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo

	2	60'@17.5 m/min	6x(3'@25m/min:1'@17m/min)	
	3	60'@17.5 m/min	29x(30'@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo
	4	60'@17.5 m/min	6x(3'@25m/min:1'@17m/min)	
	5	60'@17.5 m/min	31x(30'@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75% e 90% do PC + determinar NCM + 3 tentativas com NCM; 90" de intervalo

Quadro 1. Protocolo das intervenções que serão realizadas. PC: peso corporal; NCM: nova carga máxima; m/min: metros por minuto; TACIM=treinamento aeróbico contínuo de intensidade moderada; TIAI=treinamento intervalado de alta intensidade; TR=treinamento resistido.

Outrossim, os camundongos do grupo WR serão alojados individualmente em gaiolas equipadas com rodas adaptadas para corrida, que estarão disponíveis para os animais durante todo período de realização do estudo (seis semanas). As rodas serão equipadas com dois *hardwares* que irão coletar e armazenar informações sobre velocidade média de cada animal no instrumento, expressa em quilômetros por hora (Km/h), e a distância percorrida pelos animais será reportada em quilômetros (Km). O desenvolvimento desse sistema será realizado em parceria com o Programa de Graduação em Engenharia Eletrônica.

O grupo sedentário (Controle) será exposto ao mesmo local em que ocorrerá o treinamento, porém sem realizar exercício. Os animais serão mobilizados até a esteira de treinamento que estará desligada, onde serão colocados em baias individuais por aproximadamente dois minutos, retirados e depositados de volta em suas gaiolas.

3.4 Teste comportamental de campo aberto

Este teste permite avaliar a atividade locomotora e exploratória dos animais. Ao explorar um novo ambiente, o animal informará a respeito de sua capacidade exploratória de levantar-se nas patas traseiras (*rearing*) que tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade uma vez que esse

comportamento frequentemente se correlaciona com outras atividades como a auto-limpeza corporal, defesa e reações sexuais. As atividades indicarão que os animais estarão explorando o ambiente através dos “*crossing*” que significam atividade locomotora, e serão analisados pelo número de vezes em que o animal cruza as linhas pretas, na caixa onde se encontra para a realização do teste (Figura 14).



Figura 14. Exemplo de caixa onde será realizado o teste de campo aberto. Disponível em <http://www.uonbi.ac.ke/projects/ibro/images/documents/workshops2005/open-field-method-2005.pdf>.

O teste de habituação ao campo aberto será realizado em uma caixa de madeira de 40 x 40 cm delimitada por quatro paredes com 20 cm de altura. O piso do campo aberto é dividido em 16 quadrados iguais marcados por linhas pretas (GAVIOLI *et al.*, 2007). Na sessão de treino, os animais serão cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo da caixa, a partir do qual explorará livremente o ambiente por cinco minutos. Durante esse período, será registrado o número de cruzamentos através das linhas pretas e o número de “rearings”. O registro será realizado por um avaliador que não terá conhecimento sobre qual grupo do estudo aquele camundongo pertence.

3.5 Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos será realizado no mesmo aparato onde será feito a habituação de campo aberto. Ele será utilizado para identificar e avaliar a capacidade de memorizar e reconhecer objetos novos e já conhecidos.

No primeiro dia, será realizada a habituação do animal ao ambiente. Ele será alocado na caixa, onde permanecerá por cinco minutos, sem nenhum objeto na caixa. Após 24 horas da habituação, iniciará a sessão teste, onde o animal

será recolocado na mesma caixa, desta vez com dois objetos exatamente iguais (A1 e A2) (peças do jogo LEGO®), colocados no meio da caixa, paralelos, onde permanecerão por cinco minutos, para que os animais explorem o ambiente e os objetos livremente. O tempo de contato em cada objeto será duplamente cronometrado, para posterior análise através do índice de reconhecimento. Será considerado como contato o animal que tocar ou chegar com o nariz a menos de dois centímetros do objeto (Figura 15).

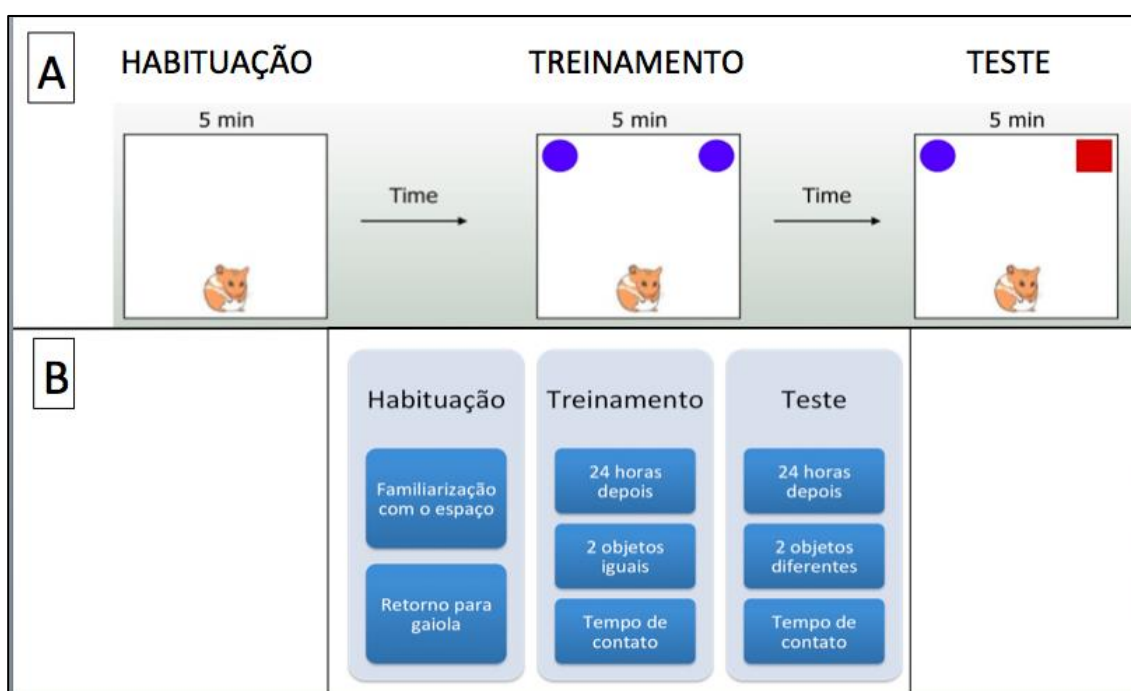


Figura 15. Exemplo da organização dos objetos (A) e cronograma (B) durante os de reconhecimento.

No mesmo dia, uma hora e meia após a sessão, iniciará o teste para memória de curta duração, onde o animal será recolocado na caixa, com dois objetos semelhantes em cor e tamanho, porém com formas diferentes (A1 e B1). O animal terá cinco minutos para explorar o ambiente.

No dia seguinte à sessão treino, será realizado o teste para memória de longa duração. O animal será recolocado na caixa com dois objetos, um que ele já estará familiarizado (A1) e um objeto totalmente diferente em cor, tamanho e forma (C1). O animal terá também cinco minutos para explorar o novo ambiente (IZQUIERDO *et al.*, 2006).

Para a análise dos resultados será usado o índice de reconhecimento para cada teste. O índice é calculado pela fórmula $TB1 / (TA1 + T1B)$, onde TA é o

tempo gasto para explorar um objeto família, que já é conhecido do animal, e TB é o tempo gasto para explorar o novo objeto.

3.6 Aptidão cardiorrespiratória

Será realizado um teste máximo de esforço individual nos grupos TACIM, TIAI e WR no primeiro dia após a fase de familiarização dos animais com a esteira e no primeiro dia após o término da intervenção. Os animais serão familiarizados com a esteira no dia anterior ao primeiro teste, sendo a mesma configurada para a velocidade de 10m/min por 20 minutos. Nessa fase, serão dispostos oito animais por ciclo na esteira, totalizando seis ciclos de familiarização. No dia seguinte, será colocado um animal por vez na esteira. Ele iniciará correndo à 10 metros/minuto, onde a cada dois minutos a velocidade será aumentada em dois metros/minuto. Serão utilizados choques elétricos, com corrente de 1,5 mA, de modo a encorajá-lo a correr. Será considerado como exaustão quando os animais ficarem na grade de choque por mais de cinco segundos contínuos.

3.7 Amostras biológicas

A eutanásia dos animais ocorrerá no dia seguinte ao término dos testes de aptidão cardiorrespiratória. Serão coletados o sangue total e o encéfalo dos camundongos. O sangue será utilizado para a separação de linfócitos e soro, enquanto que o encéfalo será dissecado em córtex cerebral e hipocampo, os quais serão utilizados para avaliação da atividade do BDNF, acetilcolinesterase, Na^+ , K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase, além de parâmetros de estresse oxidativo.

3.8 Preparação do tecido cerebral

Após testes comportamentais e de esforço máximo, os animais serão anestesiados sob atmosfera de halotano, eutanasiados por uma médica veterinária especializada neste procedimento. Após, a eutanásia, haverá a decapitação e o cérebro será removido e separado em córtex cerebral e hipocampo e colocado numa solução de Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, em gelo. As estruturas cerebrais serão homogeneizadas suavemente em um pote de vidro na solução Tris-HCl. As alíquotas dos homogeneizados resultantes da estrutura do cérebro serão armazenadas a -20°C até a utilização (GUTIERRES *et al.*,

2012). A proteína será determinada anteriormente em uma tira que variará para cada estrutura: córtex cerebral (0,7 mg / ml) e hipocampo (0,8 mg / ml), conforme determinado pelo método de azul de Coomassie, como descrito anteriormente (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino como solução padrão.

3.9 Medida da concentração de BDNF livre total

As áreas cerebrais relacionadas à memória (córtex e hipocampo) serão separadas e homogeneizadas em tampão de lise contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100 e um tablete de coquetel de inibidores de proteases e fosfatases. Os homogenatos serão centrifugados a 12.000 rpm, por 15 min, a 4°C e os sobrenadantes serão separados e armazenados a 80°C.

Para a dosagem da concentração de BDNF nas amostras do córtex e hipocampo, será utilizado um kit de ELISA sanduíche (enzyme-linked immunosorbent assay - BDNF Emax® ImmunoAssay System (PROMEGA / ref G7611), para detecção sensível e específica de BDNF maduro, livre nas amostras. As amostras serão diluídas em tampão de bloqueio ("block and sample 1x", fornecido pelo kit). Inicialmente, uma placa de 96 poços de fundo plano foi revestida com anticorpo anti-BDNF monoclonal (mAb) para ligar ao BDNF solúvel ao fundo da placa. Após essa incubação, a placa será preenchida com o tampão de bloqueio para bloquear ligações não específicas. Em seguida, com o padrão de BDNF fornecido pelo kit uma curva-padrão foi preparada (com concentrações variando entre 7,8 e 500 pg/mL). Após aplicar os volumes relacionados à curva-padrão e as amostras teciduais à placa, o anticorpo policlonal de BDNF (pAb) será adicionado. Em seguida, a placa será lavada, o anticorpo anti-IgY será adicionado seguido do substrato cromogênico tetrametilbenzidina (TMB). A quantidade de BDNF na solução de ensaio será proporcional à intensidade da cor gerada na reação de oxidação-redução. Ao final, a reação será interrompida com ácido clorídrico 1N e a leitura será feita na leitora de placa Biotek Eon, com software Gen 5 2.0, a 450nm.

3.10. Medida da atividade da AChE

O teste enzimático de AChE será determinado por uma modificação do método espectrofotométrico (GUTIERRES *et al.*, 2012) como descrito

anteriormente (ELLMAN *et al.*, 1961). A mistura reacional irá conter tampão de K^+ fosfato 100 mM, pH 7,5 e ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzóico 1 mM (DTNB). O método baseia-se na formação do anião amarelo, 5,5'-ditio-bis-ácido-nitrobenzóico, medido por absorvência a 412 nm durante 2 min de incubação a 25 ° C. A enzima (40-50 µg de proteína) será pré-incubada durante 2 min. A reação será iniciada pela adição de iodeto de acetiltiocolina 0,8 mM (AcSCh). Todas as amostras serão executadas em triplicata e a atividade enzimática será expressa em µmol de AcSCh / h / mg de proteína.

3.11 Medida da atividade da Na^+,K^+ -ATPase:

A atividade de Na^+K^+ -ATPase será medida como anteriormente descrito (CARVALHO *et al.*, 2012). Resumidamente, a análise consistirá em 30 tampões Tris-HCl (pH 7,4), (em mM) 0,1 EDTA, 50 NaCl, 5 KCl, 6 $MgCl_2$ e 50 µg de proteína na presença ou ausência de ouabaína (1 mM), em um volume final de 350 µL. A reação será iniciada pela adição de trifosfato de adenosina até uma concentração final de 3 mM. Após 30 min a 37 ° C, a reação será interrompida pela adição de 70 µL de ácido tricloroacético a 50% (p / v). Controles apropriados irão ser incluídos nos ensaios de hidrólise não enzimática de ATP. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberada será quantificada por colorimetria (FISKE e SUBBAROW, 1927), usando KH_2PO_4 como padrão de referência. A atividade específica de Na^+,K^+ -ATPase será calculada subtraindo a atividade insensível à ouabaína da atividade geral (na ausência de ouabaína) e expressa em nmol de Pi / min / mg de proteína.

3.12 Medida da atividade da Ca^{2+} -ATPase^[SEP]

A atividade de Ca^{2+} -ATPase será medida como anteriormente descrito (ROHN *et al.*, 1993) com pequenas modificações (TREVISAN *et al.*, 2009). Resumidamente, a análise consistirá de (em mM) 30 tampões Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 EGTA, 3 $MgCl_2$ e 100 µg de proteína na presença ou ausência de 0,4 $CaCl_2$, num volume final de 200 µL. A reação iniciará pela adição de trifosfato de adenosina até uma concentração final de 3 mM. Após 60 minutos a 37 ° C, a reação será interrompida pela adição de 70 µL de ácido tricloroacético a 50% (p/v). Controles apropriados serão incluídos nos ensaios de hidrólise não enzimática de ATP. A quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberada será

quantificada colorimetricamente, conforme descrito anteriormente (FISKE e SUBBAROW, 1927), usando KH_2PO_4 como padrão de referência. A atividade de Ca^{2+} -ATPase será determinada subtraindo a atividade medida na presença de Ca^{2+} a partir daquela determinada na ausência de Ca^{2+} (sem Ca^{2+} adicionado mais EGTA 0,1 mM) e expressa em nmol de Pi / min / mg de proteína.

3.13 Determinação de parâmetros do estresse oxidativo

Uma parte das estruturas cerebrais serão homogeneizadas em tampão fosfato de sódio 20 mM e 140 mM KCl pH 7,4. Os homogenatos serão centrifugados e o sobrenadante será utilizado para a determinação dos seguintes parâmetros:

3.13.1 Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS): Será realizada pelo método de Esterbauer & Cheeseman (1990). Os resultados serão expressos em nmol de TBARS/mg de proteína.

3.13.2 Medida do conteúdo tiólico total: Será realizada pelo método de Aksenov & Markesbery (2001). Os resultados serão expressos em nmol de TNB/mg de proteína.

3.13.3. Determinação da atividade da catalase (CAT): Será determinada de acordo com o método descrito por Aebi (1984). Os resultados serão expressos em unidades de atividade de catalase (sendo uma unidade definida como a quantidade de enzima que decompõe 1 μmol de H_2O_2 /min/mg de proteína).

3.13.4 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD): O método utilizado será conforme Oberley & Spitz (1989). Uma unidade de atividade de SOD é definida como a quantidade necessária para reduzir a velocidade da reação em 50%.

3.13.5 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPX): A atividade da glutathiona peroxidase será determinada através de kit comercial

(RANSEL®; Randox Lab Antrim, United Kingdom), e a atividade expressa em U/mg de proteína.

3.13.6 Determinação de espécies reativas ao oxigênio (ROS): O método adotado será de acordo com o utilizado por Sosa e colaboradores (2015). Os resultados serão expressos em UA (unidades arbitrárias).

4. Processamento e análise de dados

Os escores serão digitados no software Microsoft Excel® e, após a checagem para a ocorrência de erros, serão transferidos para o software estatístico STATA 13.1. Inicialmente será utilizado o teste de Shapiro-wilk para verificar a distribuição das variáveis e o teste de Bartlett para verificar a homogeneidade das variâncias. Para as análises entre os desfechos que apresentarem distribuição paramétrica entre os grupos, será utilizada a análise de variância (ANOVA), seguindo do *post-hoc* de Bonferroni quando apropriado. Para seus pares não-paramétricos, utilizar-se-á o teste de Kruskal-Wallis com o *post-hoc* de Dunn. Todas as variáveis que apresentarem diferença nas análises de linha-base serão incluídas como co-variáveis através de uma análise de covariância (ANCOVA) nos testes pós-intervenção.

Para checar as diferenças entre a linha-base e o pós-intervenção, será utilizado o teste T pareado ou o teste Wilcoxon pareado, dependendo se a distribuição das variáveis for paramétrica ou não, respectivamente. Os resultados serão considerados significativos para $p < 0,05$.

5. Seleção e treinamento dos auxiliares de pesquisa

Atuarão como auxiliares de pesquisa, os alunos integrantes do Grupo de Estudos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia do Exercício da Escola Superior de Educação Física da UFPel.

Os auxiliares de pesquisa passarão por um treinamento de sete dias em que serão orientados sobre o manuseio e alimentação dos animais, métodos de utilização da aparelhagem de laboratório e demais procedimentos que serão realizados no estudo.

6. Aspectos éticos

O projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas.

7. Divulgação dos resultados

Os resultados serão divulgados através da dissertação de mestrado exigida pelo programa, publicação no formato de artigo científico em revistas da área da saúde, apresentação de comunicações em eventos acadêmicos da área de atividade física e saúde, além de informativo veiculado na imprensa local.

8. Cronograma

	2016					2017												2018						
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
Elaboração do projeto	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Qualificação														X										
Envio projeto para CEEA															X	X								
Solicitação junto ao Biotério Central.																X	X							
Início da intervenção																			X					
Coleta de dados																					X			
Análise dos dados																					X	X		
Redação do artigo																					X	X	X	
Defesa																								X

9. Orçamento

VARIAVEL	PRODUTO	PREÇO
----------	---------	-------

TBARS	TBARS Parameter Assay Kit, 2 Plate	R\$ 319,00
SOD	Mouse/Rat SOD1/Cu-Zn SOD Antibody	R\$ 399,00
CAT	Human/Mouse/Rat Catalase Antibody	R\$ 399,00
	Human/Mouse/Rat Glutathione	
GPX	Peroxidase 3/GPX3 Antibody	R\$ 399,00
Conteúdo tiólico	Human/Mouse/Rat thiol content	
total	Antibody	R\$ 399,00
Esteira para ratos	Esteira Motorizada Digital para Ratos e	
com 6 Esteiras	Camundongos - Bonther	R\$ 9.430,00
	kit BDNF Emax® ImmunoAssay	
Kit ELISA BDNF	System (PROMEGA/ref G7611)	R\$ 2.500,00
	Hamster Mouse Mice Small Exercise	
	Toy Running Spinner Sports Wheel	
Rodas para corrida	Pets Supplies Random Color	R\$ 480,00
Acetilcolinesterase	Kit Acetylcholinesterase Assay	R\$ 941,35
Contador de voltas	Sensor magnético	R\$ 200,00
Transporte	Gasolina	
TOTAL		R\$ 15.4663,50

10. Referências

ABBOTT, N. J. et al. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiology of disease**, v. 37, n. 1, p. 13-25, 2010. ISSN 0969-9961.

ACIKGOZ, O. et al. Acute exhaustive exercise does not alter lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. **Neuroscience letters**, v. 406, n. 1, p. 148-151, 2006. ISSN 0304-3940.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984. ISSN 0076-6879.

AFZALPOUR, M. E. et al. Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. **Physiology & behavior**, v. 147, p. 78-83, 2015. ISSN 0031-9384.

AGRAWAL, R. et al. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 4, p. 779-787, 2009. ISSN 0028-3908.

AGSTER, K. L.; BURWELL, R. D. Cortical efferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. **Hippocampus**, v. 19, n. 12, p. 1159-1186, 2009. ISSN 1098-1063.

_____. Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. **Behavioural brain research**, v. 254, p. 50-64, 2013. ISSN 0166-4328.

AHLSKOG, J. E. et al. Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. Mayo Clinic Proceedings, 2011, Elsevier. p.876-884.

AICARDI, G. et al. Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15788-15792, 2004. ISSN 0027-8424.

AINGE, J. A. et al. The role of the hippocampus in object recognition in rats: examination of the influence of task parameters and lesion size. **Behavioural brain research**, v. 167, n. 1, p. 183-195, 2006. ISSN 0166-4328.

AKSENOV, M. et al. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 103, n. 2, p. 373-383, 2001. ISSN 0306-4522.

AKSU, I. et al. Effect of acute and chronic exercise on oxidant–antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. **Neuroscience letters**, v. 452, n. 3, p. 281-285, 2009. ISSN 0304-3940.

ALOMARI, M. A. et al. Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. **Behavioural brain research**, v. 247, p. 34-39, 2013. ISSN 0166-4328.

ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? **Nature medicine**, v. 10, 2004. ISSN 1078-8956.

ANDERSEN, P. **The hippocampus book**. New York: Oxford University Press, 2007. ISBN 0195100271.

ANDREWS, Z. B.; DIANO, S.; HORVATH, T. L. Mitochondrial uncoupling proteins in the CNS: in support of function and survival. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 11, p. 829-40, Nov 2005. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003x.

ANG, E.; GOMEZ-PINILLA, F. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 24, p. 2564-2571, 2007. ISSN 0929-8673.

ARANCIBIA, S. et al. Protective effect of BDNF against beta-amyloid induced neurotoxicity in vitro and in vivo in rats. **Neurobiology of disease**, v. 31, n. 3, p. 316-326, 2008. ISSN 0969-9961.

ARAUJO, D. et al. Effects of aging on nicotinic and muscarinic autoreceptor function in the rat brain: relationship to presynaptic cholinergic markers and binding sites. **Journal of Neuroscience**, v. 10, n. 9, p. 3069-3078, 1990. ISSN 0270-6474.

ARIDA, R. M. et al. Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 31, n. 4, p. 814-822, 2007. ISSN 0278-5846.

ARMSTRONG, D.; MARPLE-HORVAT, D. Role of the cerebellum and motor cortex in the regulation of visually controlled locomotion. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 74, n. 4, p. 443-455, 1996. ISSN 0008-4212.

ARRIAGADA, P. V. et al. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 42, n. 3, p. 631-631, 1992. ISSN 0028-3878.

ARTOLA, A. et al. Long- lasting modulation of the induction of LTD and LTP in rat hippocampal CA1 by behavioural stress and environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 1, p. 261-272, 2006. ISSN 1460-9568.

ASSOCIATION, A. S. 2017 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimer's & Dementia**, v. 13, n. 4, p. 325-373, 2017/04/01/ 2017. ISSN 1552-5260. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1552526017300511> >.

AZIZI, S. A.; VENDRAME, M. Exercise: A workout for neuroregeneration. **Neuroscience letters**, v. 418, n. 3, p. 211-212, 2007. ISSN 0304-3940.

BAAR, K. Involvement of PPAR γ co-activator-1, nuclear respiratory factors 1 and 2, and PPAR α in the adaptive response to endurance exercise. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 2, p. 269-273, 2004. ISSN 1475-2719.

BARALDI, T. et al. Cognitive stimulation during lifetime and in the aged phase improved spatial memory, and altered neuroplasticity and cholinergic markers of mice. **Experimental gerontology**, v. 48, n. 8, p. 831-838, 2013. ISSN 0531-5565.

BARBOSA, F. F. et al. Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. **Behavioural brain research**, v. 232, n. 1, p. 269-277, 2012. ISSN 0166-4328.

BARKER, G. R.; WARBURTON, E. C. When is the hippocampus involved in recognition memory? **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 29, p. 10721-10731, 2011. ISSN 0270-6474.

BARTUS, R. T. et al. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, n. 4558, p. 408-414, 1982. ISSN 0036-8075.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neuroscience: Exploring the Brain**. Wolters Kluwer, 2015. ISBN 9781451109542. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=wF4GywAACAAJ> >.

BERCHTOLD, N. et al. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 133, n. 3, p. 853-861, 2005. ISSN 0306-4522.

BERNARDES, D. et al. Differential brain and spinal cord cytokine and BDNF levels in experimental autoimmune encephalomyelitis are modulated by prior and regular exercise. **Journal of neuroimmunology**, v. 264, n. 1, p. 24-34, 2013. ISSN 0165-5728.

BERNE, R. M.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy physiology**. Philadelphia, PA: Mosby/Elsevier, 2010. ISBN 9780323073622 032307362X.

BERNTSON, G. G.; SARTER, M.; CACIOPPO, J. T. Anxiety and cardiovascular reactivity: the basal forebrain cholinergic link. **Behav Brain Res**, v. 94, n. 2, p. 225-48, Aug 1998. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328.

BEST, J. R. et al. Long-Term Effects of Resistance Exercise Training on Cognition and Brain Volume in Older Women: Results from a Randomized Controlled Trial. **Journal of the International Neuropsychological Society**, v. 21, n. 10, p. 745-756, 2015. ISSN 1355-6177. Disponível em: < <https://www.cambridge.org/core/article/longterm-effects-of-resistance-exercise-training-on-cognition-and-brain-volume-in-older-women-results-from-a-randomized-controlled-trial/EE3CD46849DB34FAFCC6E00D8FC3E8F7> >.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49, n. 2, p. 3-8, 2000. ISSN 0026-0495.

BIMONTE, H. A.; NELSON, M. E.; GRANHOLM, A.-C. E. Age-related deficits as working memory load increases: relationships with growth factors. **Neurobiology of aging**, v. 24, n. 1, p. 37-48, 2003. ISSN 0197-4580.

BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337-348, 2011. ISSN 0306-4522.

BORST, S. E. et al. Effects of resistance training on insulin-like growth factor-I and IGF binding proteins. **Med Sci Sports Exerc**, v. 33, n. 4, p. 648-53, Apr 2001. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BRASIL. **Pesquisa nacional por amostra de domicílios contínua, 2014:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Rio de Janeiro 2014.

BULLARD, S. E. et al. **Encyclopedia of clinical neuropsychology:** Oxford University Press 2012.

CÁCERES, M. et al. Elevated gene expression levels distinguish human from non-human primate brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 22, p. 13030-13035, 2003. ISSN 0027-8424.

CAMANDOLA, S.; MATTSON, M. P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. **The EMBO Journal**, v. 36, n. 11, p. 1474-1492, 2017. ISSN 0261-4189.

CARAGEORGIOU, H. et al. The effects of rivastigmine plus selegiline on brain acetylcholinesterase, (Na⁺, K⁺)-, Mg²⁺-ATPase activities, antioxidant status, and learning performance of aged rats. **Neuropsychiatric disease and treatment**, 2008. ISSN 1176-6328.

CARRO, E. et al. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 8, p. 2926-2933, 2000. ISSN 0270-6474.

CARRO, E. et al. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 15, p. 5678-5684, 2001. ISSN 0270-6474.

CARTA, M. et al. Vitamin A deficiency induces motor impairments and striatal cholinergic dysfunction in rats. **Neuroscience**, v. 139, n. 4, p. 1163-1172, 2006. ISSN 0306-4522.

CARTER, C. L. et al. Sex and gender differences in Alzheimer's disease: recommendations for future research. **J Womens Health (Larchmt)**, v. 21, n. 10, p. 1018-23, Oct 2012. ISSN 1540-9996.

CARVALHO, F. B. et al. Spermidine decreases Na⁺, K⁺-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. **European journal of pharmacology**, v. 684, n. 1, p. 79-86, 2012. ISSN 0014-2999.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health reports**, v. 100, n. 2, p. 126, 1985.

CECHETTI, F. et al. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. **Brain research**, v. 1188, p. 182-188, 2008. ISSN 0006-8993.

CECHETTI, F. et al. Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. **Brain research**, v. 1157, p. 121-125, 2007. ISSN 0006-8993.

CECHETTI, F. et al. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Neurobiology of learning and memory**, v. 97, n. 1, p. 90-96, 2012. ISSN 1074-7427.

CHAUHAN, N. B.; LEE, J. M.; SIEGEL, G. J. Na, K-ATPase mRNA levels and plaque load in Alzheimer's disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 9, n. 3, p. 151-166, 1997. ISSN 0895-8696.

CHEN, H. et al. Physical activity and the risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 64, n. 4, p. 664-669, 2005. ISSN 0028-3878.

CHEN, L. Y. et al. Changes in synaptic morphology accompany actin signaling during LTP. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 20, p. 5363-5372, 2007. ISSN 0270-6474.

CHIN, J. H. et al. β -Amyloid enhances intracellular calcium rises mediated by repeated activation of intracellular calcium stores and nicotinic receptors in acutely dissociated rat basal forebrain neurons. **Brain cell biology**, v. 35, n. 2-3, p. 173-186, 2006. ISSN 1559-7105.

COHEN, A. D. et al. Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine- treated rats: possible role of GDNF. **Journal of neurochemistry**, v. 85, n. 2, p. 299-305, 2003. ISSN 1471-4159.

COHEN, S. J.; STACKMAN JR, R. W. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. **Behavioural brain research**, v. 285, p. 105-117, 2015. ISSN 0166-4328.

COMHAIR, S. A.; ERZURUM, S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2, p. L246-L255, 2002. ISSN 1040-0605.

COSTA, M. S. et al. Treadmill running frequency on anxiety and hippocampal adenosine receptors density in adult and middle-aged rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36, n. 1, p. 198-204, 2012. ISSN 0278-5846.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 295-301, Jun 2002. ISSN 0166-2236 (Print) 0166-2236 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086747> >.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C.; CHRISTIE, L.-A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 9, p. 464-472, 2007. ISSN 0166-2236.

COTMAN, C. W.; ENGESSER-CESAR, C. Exercise enhances and protects brain function. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 30, n. 2, p. 75-79, 2002. ISSN 0091-6331.

CREER, D. J. et al. Running enhances spatial pattern separation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 5, p. 2367-72, Feb 02 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133882> >.

DANI, J. A.; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 47, p. 699-729, 2007. ISSN 0362-1642.

DE SOUZA SILVA, M. A. et al. Evidence for a specific integrative mechanism for episodic memory mediated by AMPA/kainate receptors in a circuit involving medial prefrontal cortex and hippocampal CA3 region. **Cerebral Cortex**, v. 26, n. 7, p. 3000-3009, 2015. ISSN 1047-3211.

DENIO, L.; DRAKE JR, M.; PAKALNIS, A. The effect of exercise on seizure frequency. **Journal of medicine**, v. 20, n. 2, p. 171-176, 1989. ISSN 0025-7850.

DESCARTES, R. **Traité de l'homme**: Paris.[aDCD] 1664.

DESLANDES, A. et al. Exercise and mental health: many reasons to move. **Neuropsychobiology**, v. 59, n. 4, p. 191-198, 2009. ISSN 0302-282X.

DEVITO, L. M.; EICHENBAUM, H. Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the “what–where–when” components of episodic-like memory in mice. **Behavioural brain research**, v. 215, n. 2, p. 318-325, 2010. ISSN 0166-4328.

DIAS-DA-COSTA, J. S. et al. Epidemiology of leisure-time physical activity: a population-based study in southern Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 21, n. 1, p. 275-282, 2005. ISSN 0102-311X.

DING, Q. et al. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. **Neuroscience**, v. 140, n. 3, p. 823-833, 2006. ISSN 0306-4522.

DING, Y. et al. Functional improvement after motor training is correlated with synaptic plasticity in rat thalamus. **Neurological research**, v. 24, n. 8, p. 829-836, 2002. ISSN 0161-6412.

DISHMAN, R. K. et al. Neurobiology of exercise. **Obesity**, v. 14, n. 3, p. 345-356, 2006. ISSN 1930-739X.

DOHERTY, T. J. Invited review: aging and sarcopenia. **Journal of applied physiology**, v. 95, n. 4, p. 1717-1727, 2003. ISSN 8750-7587.

DOS REIS, E. A. et al. Arginine administration inhibits hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. **Brain research**, v. 951, n. 2, p. 151-157, 2002. ISSN 0006-8993.

DOS REIS-LUNARDELLI, E. A. et al. Effects of thyroid hormones on memory and on Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat brain. **Current neurovascular research**, v. 4, n. 3, p. 184-193, 2007. ISSN 1567-2026.

DOSTES, S. et al. Running per se stimulates the dendritic arbor of newborn dentate granule cells in mouse hippocampus in a duration- dependent manner. **Hippocampus**, v. 26, n. 3, p. 282-288, 2016. ISSN 1098-1063.

DUVILLARD, S. P. Exercise lactate levels: simulation and reality of aerobic and anaerobic metabolism. **European journal of applied physiology**, v. 86, n. 1, p. 3-5, 2001. ISSN 1439-6319.

EDGERTON, V. R. et al. Plasticity of the spinal neural circuitry after injury. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 27, p. 145-167, 2004. ISSN 0147-006X.

EICHENBAUM, H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 109-120, 2004. ISSN 0896-6273.

EL IDRISSE, A.; TRENNER, E. Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 21, p. 9459-9468, 1999. ISSN 0270-6474.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 881-9095, 1961. ISSN 0006-2952.

ERICKSON, K. et al. **Exercise training increases size of hippocampus and improves memory.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 108: 3017-22 p. 2011.

ERICKSON, K. I. et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 7, p. 3017-3022, 2011. ISSN 0027-8424.

ERIKSEN, H. R. et al. Physical exercise in women with intractable epilepsy. **Epilepsia**, v. 35, n. 6, p. 1256-1264, 1994. ISSN 1528-1167.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990. ISSN 0076-6879.

FABEL, K. et al. VEGF is necessary for exercise- induced adult hippocampal neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 2803-2812, 2003. ISSN 1460-9568.

FAKIRA, A. K. et al. Purkinje cell dysfunction and delayed death in plasma membrane calcium ATPase 2-heterozygous mice. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 51, n. 1, p. 22-31, 2012. ISSN 1044-7431.

FAN, D. et al. Enriched environment attenuates surgery-induced impairment of learning, memory, and neurogenesis possibly by preserving BDNF expression. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 1, p. 344-354, 2016. ISSN 0893-7648.

FARRELL, P. A.; GARTHWAITE, T. L.; GUSTAFSON, A. B. Plasma adrenocorticotropin and cortisol responses to submaximal and exhaustive exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 55, n. 5, p. 1441-1444, 1983. ISSN 8750-7587.

FERRARI, R. et al. Oxygen-mediated myocardial damage during ischemia and reperfusion: Role of the cellular defences against oxygen toxicity. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 17, n. 10, p. 937-945, 1985. ISSN 0022-2828.

FETER, N. et al. Effects of physical exercise on myelin sheath regeneration: A systematic review and meta-analysis. **Science & Sports**, 2017/08/26/ 2017. ISSN 0765-1597. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0765159717301405> >.

FISHER, B. E. et al. The effect of exercise training in improving motor performance and corticomotor excitability in people with early Parkinson's disease. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 89, n. 7, p. 1221-1229, 2008. ISSN 0003-9993.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. **Science**, v. 65, n. 1686, p. 401-403, 1927. ISSN 0036-8075.

FORDYCE, D.; WEHNER, J. Physical activity enhances spatial learning performance with an associated alteration in hippocampal protein kinase C activity in C57BL/6 and DBA/2 mice. **Brain research**, v. 619, n. 1, p. 111-119, 1993. ISSN 0006-8993.

FORDYCE, D.; WHNER, J. Effects of aging on spatial learning and hippocampal protein kinase C in mice. **Neurobiology of aging**, v. 14, n. 4, p. 309-317, 1993. ISSN 0197-4580.

FRASER, C. et al. Driving plasticity in human adult motor cortex is associated with improved motor function after brain injury. **Neuron**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2002. ISSN 0896-6273.

FREUND, T. F.; BUZSÁKI, G. Interneurons of the hippocampus. **Hippocampus**, v. 6, n. 4, p. 347-470, 1996. ISSN 1098-1063.

GALBO, H. Exercise physiology: humoral function. **Sport Science Review**, v. 1, 1992. ISSN 2069-7244.

GEERING, K. Subunit assembly and functional maturation of Na, K-ATPase. **The Journal of membrane biology**, v. 115, n. 2, p. 109-121, 1990. ISSN 0022-2631.

GLUSHCHENKO, T.; IZVARINA, N. Na⁺, K⁺-ATPase activity in neurons and glial cells of the olfactory cortex of the rat brain during the development of long-term potentiation. **Neuroscience and behavioral physiology**, v. 27, n. 1, p. 49-52, 1997. ISSN 0097-0549.

GOH, J.; LADIGES, W. Voluntary Wheel Running in Mice. **Curr Protoc Mouse Biol**, v. 5, n. 4, p. 283-90, Dec 02 2015. ISSN 2161-2617.

GOLDSHMIT, Y. et al. Treadmill training after spinal cord hemisection in mice promotes axonal sprouting and synapse formation and improves motor recovery. **Journal of neurotrauma**, v. 25, n. 5, p. 449-465, 2008. ISSN 0897-7151.

GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; OLIVEIRA, M. R. D. Oxidants, antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012. ISSN 1942-0900.

GÓMEZ-PINILLA, F.; DAO, L.; SO, V. Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. **Brain research**, v. 764, n. 1, p. 1-8, 1997. ISSN 0006-8993.

GOMEZ- PINILLA, F.; VAYNMAN, S.; YING, Z. Brain- derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 11, p. 2278-2287, 2008. ISSN 1460-9568.

GÖTZE, W. et al. Effect of physical exercise on seizure threshold (investigated by electroencephalographic telemetry). **Diseases of the nervous system**, v. 28, n. 10, p. 664-667, 1967. ISSN 0012-3714.

GRADARI, S. et al. Can Exercise Make You Smarter, Happier, and Have More Neurons? A Hormetic Perspective. **Frontiers in neuroscience**, v. 10, 2016.

GREENE, J. G.; GREENAMYRE, J. T. Manipulation of membrane potential modulates malonate- induced striatal excitotoxicity in vivo. **Journal of neurochemistry**, v. 66, n. 2, p. 637-643, 1996. ISSN 1471-4159.

GRIESBACH, G. S. et al. Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 129-139, 2004. ISSN 0306-4522.

GROSSBERG, G. T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease:: getting on and staying on. **Current Therapeutic Research**, v. 64, n. 4, p. 216-235, 2003. ISSN 0011-393X.

GROSSMAN, L. I. et al. Molecular evolution of aerobic energy metabolism in primates. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 18, n. 1, p. 26-36, 2001. ISSN 1055-7903.

GROSSMAN, L. I. et al. Accelerated evolution of the electron transport chain in anthropoid primates. **TRENDS in Genetics**, v. 20, n. 11, p. 578-585, 2004. ISSN 0168-9525.

GROVES-CHAPMAN, J. L. et al. Changes in mRNA levels for brain-derived neurotrophic factor after wheel running in rats selectively bred for high-and low-aerobic capacity. **Brain research**, v. 1425, p. 90-97, 2011. ISSN 0006-8993.

GUTIERRES, J. M. et al. Protective effects of anthocyanins on the ectonucleotidase activity in the impairment of memory induced by scopolamine in adult rats. **Life sciences**, v. 91, n. 23, p. 1221-1228, 2012. ISSN 0024-3205.

HAIDER, S. et al. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. **Age**, v. 36, n. 3, p. 9653, 2014. ISSN 0161-9152.

HAINES, D. E.; WILLIS, M. A.; WALKER, J. B. **Lippincott's illustrated Q&A review of neuroscience**. . Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins., 2011.

HALLAL, P. C. et al. Global physical activity levels: surveillance progress, pitfalls, and prospects. **The lancet**, v. 380, n. 9838, p. 247-257, 2012. ISSN 0140-6736.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American journal of medicine**, v. 91, n. 3, p. S14-S22, 1991. ISSN 0002-9343.

_____. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012. ISSN 1753-4887.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol**, v. 11, n. 3, p. 298-300, Jul 1956. ISSN 0022-1422 (Print) 0022-1422.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Science's SAGE KE**, v. 2002, n. 37, p. 14, 2002.

HARRIS, J. J.; JOLIVET, R.; ATTWELL, D. Synaptic energy use and supply. **Neuron**, v. 75, n. 5, p. 762-777, 2012. ISSN 0896-6273.

HEALTH, U. D. O.; SERVICES, H. Healthy people 2010: objectives for improving health. **Washington DC: US Public Health Service**, 2000.

HENSLEY, K.; FLOYD, R. A. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 377-383, 2002. ISSN 0003-9861.

HEPPLE, R. T. Sarcopenia--a critical perspective. **Science's SAGE KE**, v. 2003, n. 46, p. 31, 2003.

HITTI, F. L.; SIEGELBAUM, S. A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. **Nature**, v. 508, n. 7494, p. 88, 2014.

HOF, P. R.; MORRISON, J. H. The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. **Trends in neurosciences**, v. 27, n. 10, p. 607-613, 2004. ISSN 0166-2236.

HOLSCHNEIDER, D. et al. Reorganization of functional brain maps after exercise training: importance of cerebellar–thalamic–cortical pathway. **Brain research**, v. 1184, p. 96-107, 2007. ISSN 0006-8993.

HORNBERGER JR, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Canadian journal of applied physiology**, v. 29, n. 1, p. 16-31, 2004. ISSN 1066-7814.

HORVATH, T. L. et al. Brain uncoupling protein 2: uncoupled neuronal mitochondria predict thermal synapses in homeostatic centers. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 23, p. 10417-10427, 1999. ISSN 0270-6474.

HOYER, S. The abnormally aged brain. Its blood flow and oxidative metabolism. A review—part II. **Archives of gerontology and geriatrics**, v. 1, n. 3, p. 195-207, 1982. ISSN 0167-4943.

HU, Y.; RUSSEK, S. J. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. **Journal of neurochemistry**, v. 105, n. 1, p. 1-17, 2008. ISSN 1471-4159.

HUDSPETH, A. J. et al. **Principles of neural science**. McGraw-Hill, Health Professions Division, 2013. ISBN 6613968749.

HUNTER, G. R.; MCCARTHY, J. P.; BAMMAN, M. M. Effects of resistance training on older adults. **Sports medicine**, v. 34, n. 5, p. 329-348, 2004. ISSN 0112-1642.

IBBERSON, M. et al. Immunolocalization of GLUTX1 in the testis and to specific brain areas and vasopressin-containing neurons. **Endocrinology**, v. 143, n. 1, p. 276-284, 2002. ISSN 0013-7227.

IZQUIERDO, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 496-505, 2006. ISSN 0166-2236.

JAMME, I. et al. Modulation of mouse cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 7, n. 1, p. 333-337, 1995. ISSN 0959-4965.

JEE, Y.-S. et al. Effects of treadmill exercise on memory and c-Fos expression in the hippocampus of the rats with intracerebroventricular injection of streptozotocin. **Neuroscience letters**, v. 443, n. 3, p. 188-192, 2008. ISSN 0304-3940.

JENKINS, N. T. et al. Endurance exercise training effects on body fatness, VO₂max, HDL-C subfractions, and glucose tolerance are influenced by a PLIN haplotype in older Caucasians. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 3, p. 498-506, 2010. ISSN 8750-7587.

JI, L. L. Exercise- induced modulation of antioxidant defense. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 959, n. 1, p. 82-92, 2002. ISSN 1749-6632.

JONES, W.; WITHINGTON, E. The sacred disease. **Hippocrates Works With English Translation**, v. 2, p. 127-83, 1923.

JUNQUEIRA, L. C. U. et al. **Biologia celular e molecular**. Guanabara-Koogan, 2000. ISBN 8527705885.

JURGENS, H. A.; JOHNSON, R. W. Dysregulated neuronal–microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. **Experimental neurology**, v. 233, n. 1, p. 40-48, 2012. ISSN 0014-4886.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of na, K-ATPase. **Annual review of biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 511-535, 2002. ISSN 0066-4154.

KELLNER, Y. et al. The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. **Frontiers in synaptic neuroscience**, v. 6, 2014.

KESNER, R. P.; HUNSAKER, M. R. The temporal attributes of episodic memory. **Behavioural brain research**, v. 215, n. 2, p. 299-309, 2010. ISSN 0166-4328.

KINNULA, V. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. **Thorax**, v. 60, n. 8, p. 693-700, 2005. ISSN 0040-6376.

KLAUS, S. et al. The uncoupling protein UCP: a membraneous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. **International Journal of Biochemistry**, v. 23, n. 9, p. 791-801, 1991. ISSN 0020-711X.

KORTE, M. et al. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 19, p. 8856-8860, 1995. ISSN 0027-8424.

KOYAL, S. N.; BEAVER, W. L. Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. **J appl Physiol**, v. 35, n. 82, p. 236, 1973.

KUIPERS, S. D.; BRAMHAM, C. R. Brain-derived neurotrophic factor mechanisms and function in adult synaptic plasticity: new insights and implications for therapy. **Current opinion in drug discovery and development**, v. 9, n. 5, p. 580, 2006. ISSN 1367-6733.

KUMAR, A.; KURUP, P. Inhibition of membrane Na⁺-K⁺ ATPase activity: a common pathway in central nervous system disorders. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 50, p. 400-406, 2002. ISSN 0004-5772.

KUMAR, A.; SINGH, A. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 2, p. 195-203, 2015. ISSN 1734-1140.

LABOUEÈBE, G. et al. Glucose-responsive neurons of the paraventricular thalamus control sucrose-seeking behavior. **Nature neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 999-1002, 2016. ISSN 1097-6256.

LAURIN, D. et al. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. **Archives of neurology**, v. 58, n. 3, p. 498-504, 2001. ISSN 0003-9942.

LEE, C. H. et al. Age-dependent changes in calretinin immunoreactivity and its protein level in the gerbil hippocampus. **Neurochemical research**, v. 35, n. 1, p. 122-129, 2010. ISSN 0364-3190.

LEE, H.-K. et al. Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 955-960, 2000. ISSN 0028-0836.

LEE, I.-M. et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **The lancet**, v. 380, n. 9838, p. 219-229, 2012. ISSN 0140-6736.

LEES, G. et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neuroscience letters**, v. 120, n. 2, p. 159-162, 1990. ISSN 0304-3940.

LEUTGEB, J. K. et al. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. **science**, v. 315, n. 5814, p. 961-966, 2007. ISSN 0036-8075.

LEWIS, M. M. et al. Task specific influences of Parkinson's disease on the striato-thalamo-cortical and cerebello-thalamo-cortical motor circuitries. **Neuroscience**, v. 147, n. 1, p. 224-235, 2007. ISSN 0306-4522.

LI, Y. et al. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. **Neuron**, v. 59, n. 3, p. 399-412, Aug 14 2008. ISSN 1097-4199 (Electronic)

0896-6273 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701066> >.

LIANG, K. Y. et al. Exercise and Alzheimer's disease biomarkers in cognitively normal older adults. **Annals of neurology**, v. 68, n. 3, p. 311-318, 2010. ISSN 1531-8249.

LIEPERT, J.; HAMZEI, F.; WEILLER, C. Lesion-induced and training-induced brain reorganization. **Restorative neurology and neuroscience**, v. 22, n. 3-5, p. 269-277, 2004. ISSN 0922-6028.

LIGURI, G. et al. Changes in Na⁺, K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase and some soluble enzymes related to energy metabolism in brains of patients with Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 112, n. 2, p. 338-342, 1990. ISSN 0304-3940.

LINGREL, J. B.; KUNTZWEILER, T. Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 31, p. 19659-19662, 1994. ISSN 0021-9258.

LINGREL, J. B. et al. Structure-function studies of the Na, K-ATPase. **Kidney International Supplement**, n. 44, 1994. ISSN 0098-6577.

LISTA, I.; SORRENTINO, G. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 30, n. 4, p. 493-503, 2010. ISSN 0272-4340.

LIVINGSTON, S.; PAULI, L. L.; PRUCE, I. Epilepsy and sports. **JAMA**, v. 239, n. 1, p. 22-22, 1978. ISSN 0098-7484.

LLORENS-MARTIN, M.; TORRES-ALEMAN, I.; TREJO, J. L. Reviews: mechanisms mediating brain plasticity: IGF1 and adult hippocampal neurogenesis. **The neuroscientist**, v. 15, n. 2, p. 134-148, 2009. ISSN 1073-8584.

LOPEZ-LOPEZ, C.; LEROITH, D.; TORRES-ALEMAN, I. 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**, v. 101, n. 26, p. 9833-9838, 2004. ISSN 0027-8424.

LOU, S.-J. et al. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain research**, v. 1210, p. 48-55, 2008. ISSN 0006-8993.

LU, B.; CHOW, A. Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. **Journal of neuroscience research**, v. 58, n. 1, p. 76-87, 1999. ISSN 1097-4547.

LUKYANETS, I. A.; LUKYANETZ, E. A. Modulation of calcium signalling by the endoplasmic reticulum in *Carassius* neurons. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 433, n. 4, p. 591-594, 2013. ISSN 0006-291X.

MACALUSO, A.; DE VITO, G. Muscle strength, power and adaptations to resistance training in older people. **European journal of applied physiology**, v. 91, n. 4, p. 450-472, 2004. ISSN 1439-6319.

MALENKA, R. C. Synaptic plasticity and AMPA receptor trafficking. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1003, n. 1, p. 1-11, 2003. ISSN 1749-6632.

MASSEY, K. A.; ZAGO, W. M.; BERG, D. K. BDNF up-regulates $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor levels on subpopulations of hippocampal interneurons. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 33, n. 4, p. 381-388, 2006. ISSN 1044-7431.

MATSUMOTO, T. et al. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. **Nature neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 131, 2008. ISSN 1097-6256.

MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 1, n. 2, p. 120, 2000. ISSN 1471-0072.

MATTSON, M. P.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in neurosciences**, v. 27, n. 10, p. 589-594, 2004. ISSN 0166-2236.

MCARDLE, F. et al. Preconditioning of skeletal muscle against contraction-induced damage: the role of adaptations to oxidants in mice. **The Journal of physiology**, v. 561, n. 1, p. 233-244, 2004. ISSN 1469-7793.

MCKINNEY, M. Brain cholinergic vulnerability: relevance to behavior and disease. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 8, p. 1115-1124, 2005. ISSN 0006-2952.

MEDICINE, A. C. O. S. **ACSM's guidelines for exercise testing and prescription**. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. ISBN 1469826666.

MEHAN, S. et al. Dementia—A Complete Literature Review on Various Mechanisms Involves in Pathogenesis and an Intracerebroventricular Streptozotocin Induced Alzheimer's Disease. In: (Ed.). **Inflammatory Diseases-Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases**: InTech, 2012.

MEMBREZ, M. et al. GLUT8 is dispensable for embryonic development but influences hippocampal neurogenesis and heart function. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 11, p. 4268-4276, 2006. ISSN 0270-7306.

MENESES, A. 5-HT system and cognition. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 8, p. 1111-1125, 1999. ISSN 0149-7634.

MIGLIORE, L.; COPPEDE, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 674, n. 1, p. 73-84, 2009. ISSN 1383-5718.

MITCHELL, W. K. et al. Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. **Frontiers in physiology**, v. 3, 2012.

MOLTENI, R. et al. Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, v. 123, n. 2, p. 429-440, 2004. ISSN 0306-4522.

MORASKA, A. et al. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 4, p. R1321-R1329, 2000. ISSN 0363-6119.

MORRIS, J. K. et al. Aerobic exercise for Alzheimer's disease: A randomized controlled pilot trial. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0170547, 2017. ISSN 1932-6203.

MORTH, J. P. et al. A structural overview of the plasma membrane Na⁺, K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 1, p. 60, 2011. ISSN 1471-0072.

MUELLER, K. et al. Physical exercise in overweight to obese individuals induces metabolic-and neurotrophic-related structural brain plasticity. **Frontiers in human neuroscience**, v. 9, 2015.

MUFSON, E. J. et al. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 8, n. 11, p. 1703-1718, 2008. ISSN 1473-7175.

MUFSON, E. J. et al. Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 309, p. 51-67, 2015. ISSN 0306-4522.

MUMBY, D. G. et al. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. **Learning & Memory**, v. 9, n. 2, p. 49-57, 2002. ISSN 1072-0502.

MURER, M.; YAN, Q.; RAISMAN-VOZARI, R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, v. 63, n. 1, p. 71-124, 2001. ISSN 0301-0082.

NAGAHARA, A. H.; TUSZYNSKI, M. H. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 3, p. 209-19, Mar 2011. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21358740> >.

NAKATA, H.; NAKAMURA, S. Brain- derived neurotrophic factor regulates AMPA receptor trafficking to post- synaptic densities via IP3R and TRPC calcium signaling. **FEBS letters**, v. 581, n. 10, p. 2047-2054, 2007. ISSN 1873-3468.

NAYLOR, A. S. et al. Extended voluntary running inhibits exercise-induced adult hippocampal progenitor proliferation in the spontaneously hypertensive rat. **Journal of Neurophysiology**, v. 93, n. 5, p. 2406-2414, 2005. ISSN 0022-3077.

NEEPER, S. A. et al. **Exercise and brain neurotrophins**. 1995. University of California, Irvine

NEEPER, S. A. et al. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain research**, v. 726, n. 1, p. 49-56, 1996. ISSN 0006-8993.

NIEMANN, C.; GODDE, B.; VOELCKER-REHAGE, C. Not only cardiovascular, but also coordinative exercise increases hippocampal volume in older adults. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 6, 2014.

NIETO-ESTÉVEZ, V.; DEFTERALI, Ç.; VICARIO-ABEJÓN, C. IGF-I: a key growth factor that regulates neurogenesis and synaptogenesis from embryonic to adult stages of the brain. **Frontiers in neuroscience**, v. 10, 2016.

NILSSON, M.; PEKNY, M. Enriched environment and astrocytes in central nervous system regeneration. **Journal of rehabilitation medicine**, v. 39, n. 5, p. 345-352, 2007. ISSN 1650-1977.

NISHIJIMA, T.; SOYA, H. Evidence of functional hyperemia in the rat hippocampus during mild treadmill running. **Neuroscience research**, v. 54, n. 3, p. 186-191, 2006. ISSN 0168-0102.

NOOSHINFAR, E.; AKBARZADEH-BAGHBAN, A.; MEISAMI, E. Effects of increasing durations of immobilization stress on plasma corticosterone level, learning and memory and hippocampal BDNF gene expression in rats. **Neuroscience letters**, v. 500, n. 1, p. 63-66, 2011. ISSN 0304-3940.

O'REILLY, R. C.; RUDY, J. W. Conjunctive representations in learning and memory: principles of cortical and hippocampal function. **Psychological review**, v. 108, n. 2, p. 311, 2001. ISSN 1939-1471.

O'LEARY, O. F.; CRYAN, J. F. A ventral view on antidepressant action: roles for adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 12, p. 675-687, 2014. ISSN 0165-6147.

OGONOVSKY, H. et al. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. **Neurochemistry International**, v. 46, n. 8, p. 635-640, 2005/06/01/ 2005. ISSN 0197-0186. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018605000665> >.

OLIFF, H. S. et al. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. **Molecular Brain Research**, v. 61, n. 1, p. 147-153, 1998. ISSN 0169-328X.

OLIVA, A. et al. Role of hippocampal CA2 region in triggering sharp-wave ripples. **Neuron**, v. 91, n. 6, p. 1342-1355, 2016. ISSN 0896-6273.

OLIVEIRA, L. et al. Electrical stimulation and swimming in the acute phase of axonotmesis: their influence on nerve regeneration and functional recovery. **Revista de neurologia**, v. 47, n. 1, p. 11-15, 2007. ISSN 0210-0010.

ORGANIZATION, W. H. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. In: ORGANIZATION, W. H. (Ed.). Geneva, 2017.

PACAK, K. Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary adrenocortical axis. **Physiological research**, v. 49, p. S11-S18, 2000. ISSN 0862-8408.

PAPANDREOU, M. A. et al. Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. **Behavioural Brain Research**, v. 219, n. 2, p. 197-204, 2011. ISSN 0166-4328.

PARADIS, É. et al. Uncoupling protein 2: a novel player in neuroprotection. **Trends in molecular medicine**, v. 9, n. 12, p. 522-525, 2003. ISSN 1471-4914.

PATHAN, A. R. et al. Chronic administration of pioglitazone attenuates intracerebroventricular streptozotocin induced-memory impairment in rats. **Life sciences**, v. 79, n. 23, p. 2209-2216, 2006. ISSN 0024-3205.

PATTERSON, S. L. et al. Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. **Neuron**, v. 9, n. 6, p. 1081-1088, 1992. ISSN 0896-6273.

PERRY, G.; CASH, A. D.; SMITH, M. A. Alzheimer disease and oxidative stress. **BioMed Research International**, v. 2, n. 3, p. 120-123, 2002. ISSN 1110-7243.

PETERS, R. Ageing and the brain. **Postgraduate medical journal**, v. 82, n. 964, p. 84-88, 2006. ISSN 0032-5473.

PINGITORE, A. et al. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. **Nutrition**, v. 31, n. 7, p. 916-922, 2015. ISSN 0899-9007.

PISKOROWSKI, R. A. et al. Age-dependent specific changes in area CA2 of the hippocampus and social memory deficit in a mouse model of the 22q11. 2 deletion syndrome. **Neuron**, v. 89, n. 1, p. 163-176, 2016. ISSN 0896-6273.

PRINCE, M. et al. World Alzheimer Report 2015. The global impact of dementia. An analysis of prevalence, incidence, cost & trends; Alzheimer's Disease International: London. **Available at: (Accessed February 17, 2016)**, 2015.

PRINGLE, A. et al. Selective N-type calcium channel antagonist omega conotoxin MVIIA is neuroprotective against hypoxic neurodegeneration in organotypic hippocampal-slice cultures. **Stroke**, v. 27, n. 11, p. 2124-2130, 1996. ISSN 0039-2499.

PUTNAM, R. W.; FILOSA, J. A.; RITUCCI, N. A. Cellular mechanisms involved in CO₂ and acid signaling in chemosensitive neurons. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 287, n. 6, p. C1493-C1526, 2004. ISSN 0363-6143.

RADAK, Z. et al. Exercise, oxidative stress and hormesis. **Ageing research reviews**, v. 7, n. 1, p. 34-42, 2008. ISSN 1568-1637.

RADAK, Z. et al. Single bout of exercise eliminates the immobilization-induced oxidative stress in rat brain. **Neurochemistry international**, v. 39, n. 1, p. 33-38, 2001. ISSN 0197-0186.

RADAK, Z. et al. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. **Neurochemistry International**, v. 49, n. 4, p. 387-392, 2006/09/01/ 2006. ISSN 0197-0186. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018606000957> >.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European journal of pharmacology**, v. 533, n. 1, p. 222-239, 2006. ISSN 0014-2999.

RAMANATHAN, D.; CONNER, J. M.; TUSZYNSKI, M. H. A form of motor cortical plasticity that correlates with recovery of function after brain injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 30, p. 11370-11375, 2006. ISSN 0027-8424.

RASMUSSEN, P. et al. Evidence for a release of brain- derived neurotrophic factor from the brain during exercise. **Experimental physiology**, v. 94, n. 10, p. 1062-1069, 2009. ISSN 1469-445X.

RAZ, N. et al. Regional brain changes in aging healthy adults: general trends, individual differences and modifiers. **Cerebral cortex**, v. 15, n. 11, p. 1676-1689, 2005. ISSN 1047-3211.

REAGAN, L. P. et al. Localization and regulation of GLUTx1 glucose transporter in the hippocampus of streptozotocin diabetic rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 5, p. 2820-2825, 2001. ISSN 0027-8424.

REDILA, V.; CHRISTIE, B. Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 137, n. 4, p. 1299-1307, 2006. ISSN 0306-4522.

REDILA, V. A. et al. Hippocampal cell proliferation is reduced following prenatal ethanol exposure but can be rescued with voluntary exercise. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 305-311, 2006. ISSN 1098-1063.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1473, p. 1545-1564, 2006. ISSN 0962-8436.

RHEIN, V. et al. Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 47, p. 20057-20062, 2009. ISSN 0027-8424.

RIZOPOULOS, E. et al. Kinetic properties of the $[Ca^{2+} Mg^{2+}]$ -ATPase in Alzheimer and normal fibroblasts at low free calcium. **Brain research bulletin**, v. 21, n. 5, p. 825-828, 1988. ISSN 0361-9230.

RODRIGUES, L. et al. Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. **Journal of neural transmission**, v. 117, n. 11, p. 1295-1305, 2010. ISSN 0300-9564.

ROHN, T. T.; HINDS, T. R.; VINCENZI, F. F. Ion transport ATPases as targets for free radical damage: Protection by an aminosteroid of the Ca^{2+} pump atpase and Na^{+}/K^{+} pump ATPase of human red blood cell membranes. **Biochemical pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 525-534, 1993. ISSN 0006-2952.

ROJAS VEGA, S. et al. Effect of resistance exercise on serum levels of growth factors in humans. **Horm Metab Res**, v. 42, n. 13, p. 982-6, Dec 2010. ISSN 0018-5043.

ROLLS, E. T. The mechanisms for pattern completion and pattern separation in the hippocampus. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 7, 2013.

ROWNTREE, J. et al. Effect of Se on selenoprotein activity and thyroid hormone metabolism in beef and dairy cows and calves. **Journal of animal science**, v. 82, n. 10, p. 2995-3005, 2004. ISSN 1525-3163.

RUSSO-NEUSTADT, A.; CHEN, M. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant activity. **Current pharmaceutical design**, v. 11, n. 12, p. 1495-1510, 2005. ISSN 1381-6128.

SABATIER, M. J. et al. Treadmill training promotes axon regeneration in injured peripheral nerves. **Experimental neurology**, v. 211, n. 2, p. 489-493, 2008. ISSN 0014-4886.

SALEHI, A.; DELCROIX, J.-D.; MOBLEY, W. C. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. **Trends in neurosciences**, v. 26, n. 2, p. 73-80, 2003. ISSN 0166-2236.

SARTER, M.; GEHRING, W. J.; KOZAK, R. More attention must be paid: the neurobiology of attentional effort. **Brain research reviews**, v. 51, n. 2, p. 145-160, 2006. ISSN 0165-0173.

SARTER, M.; GIVENS, B.; BRUNO, J. P. The cognitive neuroscience of sustained attention: where top-down meets bottom-up. **Brain research reviews**, v. 35, n. 2, p. 146-160, 2001. ISSN 0165-0173.

SATO, T. et al. Effects of steroid hormones on (Na⁺, K⁺)-ATPase activity inhibition-induced amnesia on the step-through passive avoidance task in gonadectomized mice. **Pharmacological research**, v. 49, n. 2, p. 151-159, 2004. ISSN 1043-6618.

SCHEFER, V.; TALAN, M. I. Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. **Exp Gerontol**, v. 31, n. 3, p. 387-92, May-Jun 1996. ISSN 0531-5565 (Print) 0531-5565.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural brain research**, v. 221, n. 2, p. 555-563, 2011. ISSN 0166-4328.

SCHUMAN, E. M.; DYNES, J. L.; STEWARD, O. Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 27, p. 7143-7146, 2006. ISSN 0270-6474.

SIAMILIS, S. et al. The effect of exercise and oxidant-antioxidant intervention on the levels of neurotrophins and free radicals in spinal cord of rats. **Spinal Cord**, v. 47, n. 6, p. 453-7, Jun 2009. ISSN 1362-4393.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v. 82, n. 2, p. 291-5, Mar 1997. ISSN 0958-0670 (Print) 0958-0670.

SIM, K. et al. Hippocampal and parahippocampal volumes in schizophrenia: a structural MRI study. **Schizophrenia bulletin**, v. 32, n. 2, p. 332-340, 2005. ISSN 1745-1701.

SKOU, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochimica et biophysica acta**, v. 23, p. 394-401, 1957. ISSN 0006-3002.

SOSA, P. et al. Physical exercise prevents motor disorders and striatal oxidative imbalance after cerebral ischemia-reperfusion. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 798-804, 2015. ISSN 0100-879X.

SOYA, H. et al. Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. **Neuroscience research**, v. 58, n. 4, p. 341-348, 2007. ISSN 0168-0102.
SOYA, H. et al. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 358, n. 4, p. 961-967, 2007. ISSN 0006-291X.

SPITZ, D. R.; OBERLEY, L. W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. **Analytical biochemistry**, v. 179, n. 1, p. 8-18, 1989. ISSN 0003-2697.

STEVENSON, E. L.; CALDWELL, H. K. Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 9, p. 3294-3301, 2014. ISSN 1460-9568.

SUTOO, D. E.; AKIYAMA, K. Regulation of brain function by exercise. **Neurobiology of disease**, v. 13, n. 1, p. 1-14, 2003. ISSN 0969-9961.

SWERDLOW, R. H.; BURNS, J. M.; KHAN, S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, n. s2, p. S265-S279, 2010. ISSN 1387-2877.

SZUHANY, K. L.; BUGATTI, M.; OTTO, M. W. A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor. **Journal of psychiatric research**, v. 60, p. 56-64, 2015. ISSN 0022-3956.

SZULC, P. et al. Low skeletal muscle mass is associated with poor structural parameters of bone and impaired balance in elderly men—the MINOS study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 5, p. 721-729, 2005. ISSN 1523-4681.

TANAKA, J.-I. et al. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. **Science**, v. 319, n. 5870, p. 1683-1687, 2008. ISSN 0036-8075.

TAPIA-ARANCIBIA, L. et al. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. **Brain research reviews**, v. 59, n. 1, p. 201-220, 2008. ISSN 0165-0173.

TEN BRINKE, L. F. et al. Aerobic exercise increases hippocampal volume in older women with probable mild cognitive impairment: a 6-month randomised controlled trial. **Br J Sports Med**, v. 49, n. 4, p. 248-54, Feb 2015. ISSN 1473-0480 (Electronic) 0306-3674 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24711660> >.

THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-**, p. 593-593, 1995. ISSN 0036-8075.

TREJO, J. L.; CARRO, E.; TORRES-ALEMÁN, I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 5, p. 1628-1634, 2001. ISSN 0270-6474.

TREVISAN, G. et al. Antinociceptive effects of 14-membered cyclopeptide alkaloids. **Journal of natural products**, v. 72, n. 4, p. 608-612, 2009. ISSN 0163-3864.

UDDIN, M. et al. Sister grouping of chimpanzees and humans as revealed by genome-wide phylogenetic analysis of brain gene expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 2957-2962, 2004. ISSN 0027-8424.

VAILLEND, C. et al. Mechanisms of neuronal hyperexcitability caused by partial inhibition of Na⁺-K⁺-ATPases in the rat CA1 hippocampal region. **Journal of Neurophysiology**, v. 88, n. 6, p. 2963-2978, 2002. ISSN 0022-3077.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 23, p. 13427-13431, 1999. ISSN 0027-8424.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat neurosci**, v. 2, n. 3, p. 266-270, 1999. ISSN 1097-6256.

_____. Neural consequences of environmental enrichment. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 191, 2000. ISSN 1471-003X.

VAN PRAAG, H. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1030-1034, 2002. ISSN 0028-0836.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ- PINILLA, F. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 10, p. 2580-2590, 2004. ISSN 1460-9568.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GÓMEZ- PINILLA, F. Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. **Journal of neuroscience research**, v. 76, n. 3, p. 356-362, 2004. ISSN 1097-4547.

VELDHUIS, W. B. et al. In vivo excitotoxicity induced by ouabain, a Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 62-74, 2003. ISSN 0271-678X.

VIDAL-PUIG, A. et al. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 235, n. 1, p. 79-82, 1997. ISSN 0006-291X.

VIGNINI, A. et al. Modifications of platelet from Alzheimer disease patients: a possible relation between membrane properties and NO metabolites. **Neurobiology of aging**, v. 28, n. 7, p. 987-994, 2007. ISSN 0197-4580.

VOSS, M. W. et al. The influence of aerobic fitness on cerebral white matter integrity and cognitive function in older adults: results of a one-year exercise intervention. **Hum Brain Mapp**, v. 34, n. 11, p. 2972-85, Nov 2013. ISSN 1097-0193 (Electronic)
1065-9471 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674729> >.

WANG, D. et al. A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. **Human molecular genetics**, v. 15, n. 7, p. 1169-1179, 2006. ISSN 1460-2083.

WEISHAUPT, N.; BLESCH, A.; FOUAD, K. BDNF: the career of a multifaceted neurotrophin in spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 238, n. 2, p. 254-64, Dec 2012. ISSN 0014-4886.

WU, X.; PRIOR, R. L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography– electrospray ionization– tandem mass spectrometry in common foods in the United States: Vegetables, nuts, and grains. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 8, p. 3101-3113, 2005. ISSN 0021-8561.

WYSE, A. T. et al. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. **Physiology & behavior**, v. 80, n. 4, p. 475-479, 2004. ISSN 0031-9384.

YAMAGUCHI, M. Role of regucalcin in brain calcium signaling: involvement in aging. **Integrative Biology**, v. 4, n. 8, p. 825-837, 2012.

YOON, M.-C. et al. Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Neuroscience letters**, v. 423, n. 1, p. 12-17, 2007. ISSN 0304-3940.

ZAGNI, E.; SIMONI, L.; COLOMBO, D. Sex and gender differences in central nervous system-related disorders. **Neuroscience journal**, v. 2016, 2016. ISSN 2314-4262.

ZHAN, H. et al. Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. **Neurological research**, v. 26, n. 1, p. 35-40, 2004. ISSN 0161-6412.

ZHAO, C.; DENG, W.; GAGE, F. H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 645-660, 2008. ISSN 0092-8674.

ZHAO, Y. et al. Neuronal glucose transporter isoform 3 deficient mice demonstrate features of autism spectrum disorders. **Molecular psychiatry**, v. 15, n. 3, p. 286, 2010.

ZHOU, Z. et al. Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. **Neuron**, v. 52, n. 2, p. 255-269, 2006. ISSN 0896-6273.

2. Relatório do trabalho de campo

1. Introdução

O presente relatório do trabalho de campo abordará as etapas realizadas para que a coleta de dados do estudo intitulado “Efeitos de diferentes modelos de exercícios físicos em parâmetros cerebrais em camundongos saudáveis” pudesse ocorrer. A seguir, descrever-se-á o passo a passo da logística utilizada durante a intervenção, coleta e análise dos dados.

2. Intervenção

A elaboração da logística que foi utilizada durante os meses de intervenção começou no mês de Junho de 2017, durante a disciplina de “Planejamento e Operacionalização de Inquéritos em Saúde e Desempenho”, onde foram abordados vários aspectos referentes à metodologia do projeto. Em setembro de 2017, ocorreu a qualificação do projeto e em função da defesa, algumas modificações foram realizadas, principalmente referentes aos testes utilizados para verificar os efeitos da intervenção na memória dos animais e as análises de estresse oxidativo.

3. Contato com as docentes da Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Primeiramente, foi realizado contato com duas professoras do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da UFPel com o objetivo de estipular as datas de início e término da intervenção, visto que após o último dia de exercício, os animais de todos os grupos deveriam ser avaliados através de testes de comportamento e, após os testes, eutanasiados para coletas de tecido cerebral, muscular e sangue. Tais procedimentos foram realizados por estudantes de mestrado e doutorado do programa supracitado. Assim, a estipulação de datas para as coletas foi fundamental, de forma a garantir a participação das estudantes sem prejudicar suas atividades acadêmicas e científicas.

Ainda, foi verificada a disponibilidade da médica veterinária responsável pelo Biotério Central da UFPel para a realização da eutanásia no final de cada período

de intervenção. Através de dois docentes do Departamento de Fisiologia da UFPel foi disponibilizado o Laboratório de Fisiologia Molecular para a realização da intervenção caso necessário.

Após o projeto de ser aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPel, a solicitação dos 80 camundongos C57BL/6 para o estudo foi enviado ao Biotério Central. Após o Departamento aceitar a solicitação, decorreram aproximadamente 60 dias para que os animais fossem produzidos, desmamados e disponibilizados para o início do estudo.

4. Trabalho de campo

O trabalho de campo foi realizado durante três meses, de 24 de fevereiro à 18 de maio de 2018. Após divulgação do estudo na Escola Superior de Educação Física/UFPel e no curso de Educação Física da Faculdade Anhanguera, cinco estudantes se disponibilizaram para auxiliar no período de intervenção. Assim, o estudo seguiu a seguinte linha do tempo

1. Primeiras duas semanas de intervenção - O pesquisador responsável pelo estudo explicou aos auxiliares voluntários o funcionamento da esteira motorizada e os protocolos de cada grupo — dois grupos utilizaram esse aparato durante a intervenção. Após isso, os estudantes realizam o treinamento dos animais na esteira, geralmente em grupo de quatro pessoas por sessão de treinamento de cada grupo. Simultaneamente, o pesquisador responsável conduziu o treinamento resistido nos animais designados para esse protocolo. As sessões de treinamento foram realizadas a tarde, começando as 14h e com duração de aproximadamente três horas. Houve dias que os protocolos foram realizados com facilidade, em razão dos animais não demonstrarem dificuldade para correr ou escalar; assim, os protocolos eram finalizados as 16h.

2. Terceira semana – Os auxiliares voluntários começaram a apresentar divergências ideológicas, o que comprometeu, em parte, a relação entre eles e o bom andamento das atividades. Após isso, dois estudantes tiveram suas disponibilidades reduzidas, em razão de tarefas profissionais e acadêmicas. Assim, foi necessário contatar outros alunos para repor o número de voluntários necessários para o andamento do estudo. Através de uma nova seleção para

estagiários do grupo de estudo do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Exercício da ESEF/UFPeI, três estudantes se disponibilizaram para participar do estudo como voluntários.

3. Quarta, quinta e sexta semana – As semanas finais de intervenção ocorreram sem problemas.

4. Semana de coleta de dados – Os dados de comportamento foram coletados por estudantes de doutorado e mestrado do PPGBB/UFPeI. Após quatro dias de testes de comportamento, o quinto dia foi reservado para eutanásia e coleta de tecidos.

5. Codificação e digitação dos dados

As anotações referentes aos testes de comportamento foram realizadas em cadernos pelas estudantes responsáveis por cada medida. Os valores foram digitados no software Microsoft Excel e então repassados para o pesquisador responsável.

6. Análise dos dados

O banco de dados foi exportado para o programa STATA, versão 13.1. A análise de dados foi realizada pelo pesquisador responsável em conjunto com seu orientador. A amostra foi composta por 80 camundongos fêmeas com 60 dias. Em relação ao controle de qualidade, todas as etapas da pesquisa foram realizadas sob supervisão do pesquisador responsável.

7. Análises bioquímicas

As análises das enzimas Na⁺/K⁺-ATPase e Ca²⁺-ATPase e do BDNF não foram realizadas devido a falta de kit para realizar as medidas. Ainda, não era esperada a análise dos níveis de nitrito nos tecidos cerebrais. No entanto, este se tornou o principal achado do estudo.

8. Testes de memória espacial

Seguindo as indicações da banca de qualificação, foi adicionado aos testes de memória o Y-maze, que buscou avaliar a memória espacial dos camundongos.

3. Artigo nas normas do periódico “Physiology and Behavior”

Title page

Title: How does physical activity and different models of exercise training affect oxidative parameters and memory?

Natan Feter^a

Airton José Rombaldi^a

^a Post-graduate Program in Physical Education, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil - 96055-630.

Corresponding author

Natan Feter

natanfeter@hotmail.com

+55 53 981125830

Abstract

The present study investigated the chronic effects of different physical exercise and physical activity models on cognitive function, cholinergic activity, and oxidative stress markers in the cerebral cortex and hippocampus. Eighty 60-day C57BL/6 mice were divided into five groups: sedentary (SED), moderate-intensity continuous training (MICT), high-intensity interval training (HIIT), resistance training (RT), and physical activity (RW). Cognitive function (recognition and spatial memory), oxidative stress parameters, and acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex and hippocampus were evaluated. MICT mice exhibited an enhanced recognition memory compared to SED mice ($p=0.046$) and other exercised groups (HIIT: $p<0.001$; RW: $p=0.003$; RT: $p<0.001$). RT group showed better spatial memory compared to SED ($p=0.004$), MICT ($p=0.019$) and RW ($p=0.003$) groups. RW, MICT, HIIT, and RT training models reduced nitrite compared to SED at hippocampus. RT lead to a significant increase in both lipid peroxidation ($p=0.01$) and reactive oxygen species (ROS) ($p<0.001$) levels compared to SED at hippocampus. MICT promoted an increasing in catalase (CAT) activity ($p=0.002$) while superoxide dismutase (SOD) activity was diminished at RT comparing to MICT and HIIT ($p=0.008$). In cerebral cortex, RT increased ROS level, but it exhibited the lowest lipid peroxidation level among groups ($p<0.001$). RW presented an activity-induced increasing in lipid peroxidation level compared to SED and the highest level of CAT activity among all groups ($p<0.001$). AChE activity was higher in RT compared to SED, MICT and RW groups ($p=0.039$) in cerebral cortex. In summary, we showed that nitrite level in hippocampus was decreased in intervention groups regardless activity or exercise model. Likewise, MICT improved recognition memory besides increased CAT activity. Although RT showed elevated ROS and lipid peroxidation level at hippocampus, this model could enhance spatial memory.

Highlights:

- Reduction of nitrite at hippocampus is independent of training and activity model.
- Moderate-intensity continuous training improved recognition memory.
- Resistance training enhanced spatial memory.
- Moderate-intensity continuous training up-regulated antioxidant activity.

Keywords: exercise; brain; memory; oxidative stress.

1. Introduction

Oxidative stress is marked by excessive production of reactive oxygen species (ROS) and insufficient activity of antioxidant defense mechanisms. Due to its high metabolic rate and low levels of antioxidant enzymes, resistance of brain to ROS-induced damage is relatively reduced[1]. Chronically OS may induce cellular damage and mitochondrial dysfunction[2], both key factors in acceleration of age-related process and development of neurodegenerative diseases (NDD) [3–5]. Indeed, studies have reported elevated markers of lipid peroxidation and protein oxidation in hippocampus and cerebral cortex in individuals with Alzheimer's disease (AD) [6,7].

Those brain regions are particularly related to cognitive functions. Recent studies have linked physical exercise (PE) (both aerobic and resistance exercise) to spatial learning and memory, which critically rely on the hippocampus[8,9]. Spatial memory is responsible for the recording of information about environment and spatial orientation and it is a fundamental cognitive faculty[10]. It is often argued that in both humans and animals, spatial memories are summarized as a cognitive map. Similarly, recognition memory is the ability to recognize previously encountered events, objects, or people. When a previously experienced event is reexperienced, this environmental content is matched to stored memory representations, eliciting matching signals [11]. Despite the quantity of literature suggesting the beneficial effects of physical exercise on the brain, only a few studies have specifically targeted the effects of aerobic and resistance physical exercise on spatial learning and memory and the cellular and molecular mechanisms underlying such effects[12].

Physical exercise and physical activity (PA) appear so as non-pharmacological strategies to control the level of ROS[13,14] and thus influence a wide range of signaling processes and consequently the function of the brain. Although accumulating evidence suggests that ROS are increased after a session of PE, antioxidant defense mechanism sufficiently overcomes ROS. However, as they are increased, antioxidants are not enough to protect the cells, resulting in oxidative damage[15]. In addition, regular PA seems to lower the incidence of cognitive impairment, depression and dementia[16,17]. This indicates a improvement by PA in antioxidant defenses and decreasing in lipid peroxidation

levels both in adult and in aged individuals[14], emphasizing its importance to decelerate the aging-associated impairment process. Similarly, longitudinal studies have reported engaging in greater amounts of PA is associated with elevated hippocampal and prefrontal cortex volume later in life, besides improvement in spatial memory[18,19], Taken together, these results suggest that higher level of PA may have long-term consequences for maintaining brain integrity into late adulthood[20,21].

In summary, available evidences suggest that low- to moderate-intensity PE or higher amounts of PA may improve brain health throughout the lifespan and reduce the risk for neurological and psychiatric conditions. However, we still have a very poor understanding of how exercise influences cognition. In this sense, considering the gap in the literature in comparing different models of PE and PA in memory and their relationship with oxidative damage, the Cerebral Remodeling Research on different Types of Exercise (CORTEX) study was elaborated. Here, we investigated the effects of high-intensity interval training, moderate-intensity continuous training, resistance training and physical activity model on spatial and recognition memory in mice. To delineate a possible mechanism of action for each intervention, it was also investigated the activity of acetylcholinesterase, as well as oxidative stress markers, in the cerebral cortex and hippocampus of these animals.

2. Material and methods

Eighty female C57BL/6 mice (60 days old), weighing 20–24 g, were used in the study. The animals were maintained in the Central Animal House of the Federal University of Pelotas at ambient temperature of 23 ± 2 °C and relative humidity of 86% with 12 hours- light/dark cycles. Food and water was available ad libitum. Mice were housed in cages with four animals per cage with exception of running wheel (RW) group which animals were housed individually in order to avoid any dominance by a mouse on wheel running use. [22–24]. All procedures were carried out according to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care. This work was approved by the ethical committee on animal experimentation of the Federal University of Pelotas (protocol number 23110.008380/2017-35).

2.1. Randomization and familiarization

All animals were randomly divided into five groups (n=16 per group): SED: sedentary group; MICT: moderate-intensity continuous training; HIIT: high-intensity interval training; RW: running wheel; RT: resistance training.

MICT and HIIT group were familiarized with a digital motorized 5-lane treadmill for mice (Bonther®, São Paulo) during five days (Monday-Friday). According to Schefer e Talan [25], sedentary mice reach its maximum oxygen consumption in treadmill at 25 m/min. Based on this information, mice ran during familiarization period for 10 minutes per day at 10 m/min. The animals were motivated to run via electrical shocks (1.0mA) positioned at the end of each lane.

Mice at RT group were familiarized with a custom-made vertical ladder (90cm × 15cm, 1.5cm separation between steps, 85° incline) on three occasions during the first week (Monday-Wednesday-Friday). On the first day, mice climbed without an extra load. On the next 2 days, a load pouch containing lead weights corresponding to 50% of the mice's body weight was fixed to the proximal part of the tail with a Velcro strap. Next, the animals began a progressive resistance training period (Table 1). Neither RW nor SED group had familiarization period.

2.2. Experimental protocols

All interventions protocols started at second day after familiarization period and lasted six weeks (Figure 1). Also, exercise training was performed during 6-week period at controlled ambient with temperature at 23°C and between 14pm and 17pm.

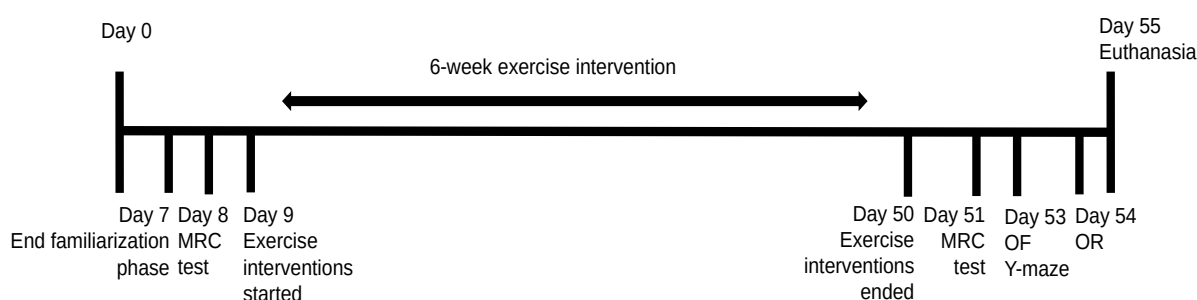


Figure 1. Scheme of protocol utilized during the study. OR: object recognition; MRC: maximum running capacity; OF: open field.

2.2.1. Resistance training

The RT protocol was established based on the one adopted by Hornberger & Farrar[26] with some changes. The training sessions took place three times a week (Monday-Wednesday-Friday), and started with three climbs at 50, 75 and 90% of the previous maximal load (ML). In the last session of each week, a new maximum load was established (Table 1). This test was carried out just after the 90% climb by increasing the previous load in 1 g until a new ML was reached. Between the climbing trials, mice were allowed to rest for 90 s in a closed chamber (30cm×15cm×11cm) located at the top of the ladder. No punishment or rewarded were used to motivate animals to climb.

2.2.2. Moderate-intensity continuous training

After familiarization phase, animals performed the training protocol five days per week (Monday to Friday). All sessions were composed by 1-min warm up and 1-min cool-down at 16m/min, which corresponds to 64% of the maximum oxygen consumption. After warm-up, MICT mice started to run at a speed of 17m/min for 20 minutes. After each session, the volume of exercise was increased by 2 minutes per session until maximum of 60 minutes (Table 1).

2.2.3. High-intensity interval training

The HIIT group initiated the training protocol by performing two sprints lasting three minutes at 25 m/min (100% of the highest speed achieved at maximum running capacity test), with 60-seconds resting period at 16 m/min between sprints. In the following sessions, mice interchanged between sprints lasting three minutes and 30 seconds, with constant resting period[27]. The whole protocol is described in Table 1.

2.2.4. Running wheel

Mice from RW group were housed individually in cages equipped with adapted-running wheel, which were available to the animals during the study period (six weeks). The RW were equipped with two hardware that daily collected and stored information on the average speed of each animal, expressed in

kilometers per hour (km/h), and the distance covered by each animal reported in kilometers (Km).

2.2.5. Sedentary group

The SED group did not have access to any type of exercise training or exercise-related equipment in their cages. Mice were taken to motorized treadmill used in MICT and HIIT. The treadmill was turned off during this procedure. They were placed in individual stalls for approximately two minutes, removed and deposited back into their cages. Before putting SED animals in treadmill, the equipment was cleaned with 40% alcohol to avoid any stress related with animal from other groups.

Week	Day	MICT	HIIT	RT
1	1	20'@17.5 m/min	2x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	2	22'@17.5 m/min	3x(30"@25m/min:1'@17m/min)	
	3	24'@17.5 m/min	2x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	4	26'@17.5 m/min	5x(30"@25m/min:1'@17m/min)	
	5	28'@17.5 m/min	2x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML + 3 trials to set new ML
2	1	30'@17.5 m/min	7x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	2	32'@17.5 m/min	3x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	
	3	34'@17.5 m/min	9x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	4	36'@17.5 m/min	3x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	
	5	38'@17.5 m/min	11x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML + 3 trials to set new ML
3	1	40'@17.5 m/min	3x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	2	42'@17.5 m/min	13x(30"@25m/min:1'@17m/min)	
	3	44'@17.5 m/min	4x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	4	46'@17.5 m/min	15x(30"@25m/min:1'@17m/min)	
	5	48'@17.5 m/min	4x(3'@ 25m/min)	50%, 75%, 90% ML + 3 trials to set new ML
4	1	50'@17.5 m/min	17x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	2	52'@17.5 m/min	4x(3'@ 25m/min)	
	3	54'@17.5 m/min	19x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	4	56'@17.5 m/min	5x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	
	5	58'@17.5 m/min	21x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML + 3 trials to set new ML
5	1	60'@17.5 m/min	5x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	2	60'@17.5 m/min	23x(30"@25m/min:1'@17m/min)	
	3	60'@17.5 m/min	5x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	4	60'@17.5 m/min	25x(30"@25m/min:1'@17m/min)	
	5	60'@17.5 m/min	6x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML + 3 trials to set new ML
6	1	60'@17.5 m/min	27x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	2	60'@17.5 m/min	6x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	
	3	60'@17.5 m/min	29x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML
	4	60'@17.5 m/min	6x(3'@ 25m/min:1'@17m/min)	
	5	60'@17.5 m/min	31x(30"@25m/min:1'@17m/min)	50%, 75%, 90% ML + 3 trials to set new ML

Legend: MICT: moderate-intensity continuous training; HIIT: high-intensity interval training; RT: resistance training; m/min: meters per minute; ML: maximum load;

Figure 2. Exercise training protocols.

2.3. Behavior tasks

2.3.1. Open-field

The animals were transferred to a 30×30×30-cm open field, with the floor divided into four squares. During the 5-min open-field session, the number of crossing, rearing, and grooming responses was recorded. The open field was used to identify motor disabilities which might influence the novel object recognition task and Y-maze test [28].

2.3.2. Object recognition

The object recognition test is based on the natural tendency of rodents to investigate a novel object instead of a familiar one. The choice to explore the novel object reflects the use of learning and recognition memory processes. The available object-recognition task aimed to test short-term recognition memory [29].

During the experiment, chambers and objects were cleaned after each animal testing with 40% alcohol. The novel object recognition task was performed as described elsewhere[29]. The animals were randomly selected to perform the behavioral task and the studies were conducted in a blinded manner. The task consisted of training and testing sessions.

In the training session, mice were exposed to two equal objects (object A and B), and the exploration time, corresponding to animal's nose touch or get close the object (a distance of less than 2 cm) was recorded with two stopwatches. The test session was carried out 2h after training. Mice were placed back in the behavioral chamber and one of the familiar objects (i.e., object B) was replaced by a novel object (i.e., object C). The time spent exploring the familiar and the novel objects were recorded. The discrimination index was then calculated, taking into account the difference of time spent exploring the novel (B) and the familiar (A) object $\times 100$ divided by the sum of time spent exploring the novel (B) and the familiar (A), and used as a cognitive parameter $[(T_{\text{novel}} - T_{\text{familiar}})/(T_{\text{novel}} + T_{\text{familiar}})]/100$ [30].

2.3.3. Y Maze Spontaneous Alternation Test

Y-Maze Spontaneous Alternation is a behavioral test for measuring the short-term spatial memory. Rodents typically prefer to investigate a new arm of the maze rather than returning to one that was previously visited. Many parts of the brain including the hippocampus and prefrontal cortex are involved in this task.

Testing occurs in a Y-shaped maze with three arms at a 120° angle from each other and was compound by a training and testing sessions. At training session, mice were introduced to the center of the maze, where the animal was allowed to freely explore two arms (1 and 2). The number of arm entries and time spent in each arm were recorded in order to calculate the percentage of alternation. An

entry occurred when all four limbs are within the arm. After two hours from training session, the animals could have access to the same arms available at training session plus a novel one. Data regarding number of arm entries and time spent in each arm was also recorded. This test is used to quantify cognitive deficits in mice and evaluate novel pharmacological and non-pharmacological alternatives to improve cognition and memory[31].

2.4. Maximum running capacity test

An incremental protocol was applied in order to verify maximum exercise capacity before and after intervention period. The protocol started at speed of 10 m/min and after every there was an increment of 3 m/min. The animals were motivated to run via electrical shocks (1.5mA) positioned at the end of each lane. The exercise session lasted until exhaustion, which was defined as the mouse's inability to maintain running speed despite being in contact with the electrical grid for more than five consecutive seconds[32].

2.5. Biochemical analysis

2.5.1. Samples Preparation for Biochemical Parameters Analyses

After the behavioral tests, the animals were anesthetized and euthanized by cardiac puncture, and the brain was immediately removed and dissected in cerebral cortex and hippocampus. For oxidative stress analysis, both brain structures were homogenized in sodium phosphate buffer (20 mM) containing KCl (140 mM), pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 2500g for ten minutes at 4°C and the supernatant was separated to analyze oxidative stress parameters. The samples were stored at -80°C until utilization. Protein content was determined using the Lowry method [33], with bovine serum albumin as the standard solution

2.5.2. AChE activity determination

The protein content was determined using the Coomassie blue method, with bovine serum albumin as the standard solution [34]. The AChE enzymatic assay was determined using a spectrophotometric method [35]. This method is based on the formation of the yellow anion, 5,5'-dithiobis-acid-nitrobenzoic, which was measured by absorbance at 412 nm, over a 2-min period at 25°C. The enzyme (40–50 µg of protein) was pre-incubated for 2 min. The reaction was

initiated by adding 0.8 mM AcSCh. All samples were tested twice and the enzyme activity was expressed in $\mu\text{mol AcSCh/h/mg}$ of protein.

2.5.3. Oxidative stress

2.5.3.1. Reactive oxygen species (ROS) determination

ROS formation was determined as previously described[36] with some modifications. The method was based on the oxidation of DCFH-DA to fluorescent dichlorofluorescein (DCF). DCF fluorescence was measured using excitation at 485 nm and emission at 520 nm 30 minutes after the addition of DCFH-DA to the sample. ROS levels were expressed as $\mu\text{mol DCF/mg}$ of protein.

2.5.3.2. Nitrite levels quantification

Nitrite (NO_2^-) content was measured using the Griess reaction, as previously described[37]. Briefly, 50 μL of sample plus 50 μL of sulphanilamide in 5% phosphoric acid were incubated for 10 minutes at room temperature. Next, 50 μL of N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride was added and the mixture was incubated for 10 minutes at room temperature while protected from illumination. Absorbance at 540 nm was measured in a 96-well microplate reader. A sodium nitrite solution was used as the reference standard and the results were expressed as $\mu\text{mol NO}_2^-/\text{mg}$ of protein.

2.5.3.3. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) level method

TBARS was used to determine lipid peroxidation through the malondialdehyde (MDA) levels according to a method described previously[38]. Briefly, 100 μL of tissue homogenate was mixed with 15% TCA and 0.67% thiobarbituric acid. This mixture was heated at 95°C for 30 minutes and cooled (4°C) after for 10 minutes. The absorbance was measured at 532 nm and the results were expressed as nmol TBARS/mg of protein.

2.5.3.4. Total thiol level assay

The total level of thiol groups was measured using the DTNB method according to a modified, previously described method[39]. Briefly, 10 μL of sample was mixed with 145 μL of PBS–EDTA (1 mM), pH 7.5. For the reaction,

10 μ L of DTNB (10 mM) in PBS was added to the mixture. After one hour of incubation at room temperature, the absorbance was read at 412 nm and the results were expressed as nmol TNB/mg of protein.

2.5.3.5. Superoxide dismutase (SOD) activity assay

The activity of SOD was determined using a method that is based on measuring the inhibition of the autoxidation of adrenaline as described previously[40]. For this assay, the medium contained catalase (10 μ M), 10 μ L of sample, glycine buffer (50 mM, pH 10.2) and adrenaline (60 mM). SOD levels were assayed using the sample absorbance at 480 nm. The results were expressed as Units/mg of protein. One unit of SOD was defined as the amount of enzyme necessary to inhibit 50% of adrenaline autoxidation.

2.5.3.6. Catalase (CAT) activity assay

CAT activity was measured according to a previously described method[41]. For this analysis, 10 μ L of sample was mixed with Triton X-100 (1:10 w/v) and potassium phosphate buffer (pH 7.0). The reaction was started with the addition of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the reaction medium. This method is based on the ability of the CAT to decompose H_2O_2 and is measured by the decrease in absorbance at 240 nm. One unit of CAT was defined as one μ mol of H_2O_2 consumed per minute and the specific activity was expressed as Units/mg of protein.

2.6. Statistical analysis

Firstly, Shapiro-wilk test was used to verify each variable distribution and the Bartlett's test to verify homogeneity of variances. For analyzes between outcomes with normal distribution between the groups, T test or analysis of variance (ANOVA) following the Newman-Keuls post-hoc when appropriate were adopted. For its non-parametric pairs, the Kruskal-Wallis test was chosen with Dunn post-hoc. Repeated-measures ANOVA for analysis of the effect of time in body weight and ML was also ran.

To check the differences between the baseline and post-intervention, paired T test or the paired Wilcoxon test were preferred, depending on whether the distribution of the variables is parametric or not, respectively. The results were

considered significant at $p < 0.05$. Stata 13.1[42] and Prism 7[43] were used to analyze and present the data. Data showed as mean $\pm$ standard error (SE).

3. Results

One animal in the HIIT group could not complete the training program because it was not able to keep running at any velocity set on treadmill, leading to its exclusion from the study. Comparing post-intervention to baseline, only RW group showed significant change in body weight (-2.0 ; 95%CI: -2.66 , -1.33 ; $p < 0.001$) (Figure 3).

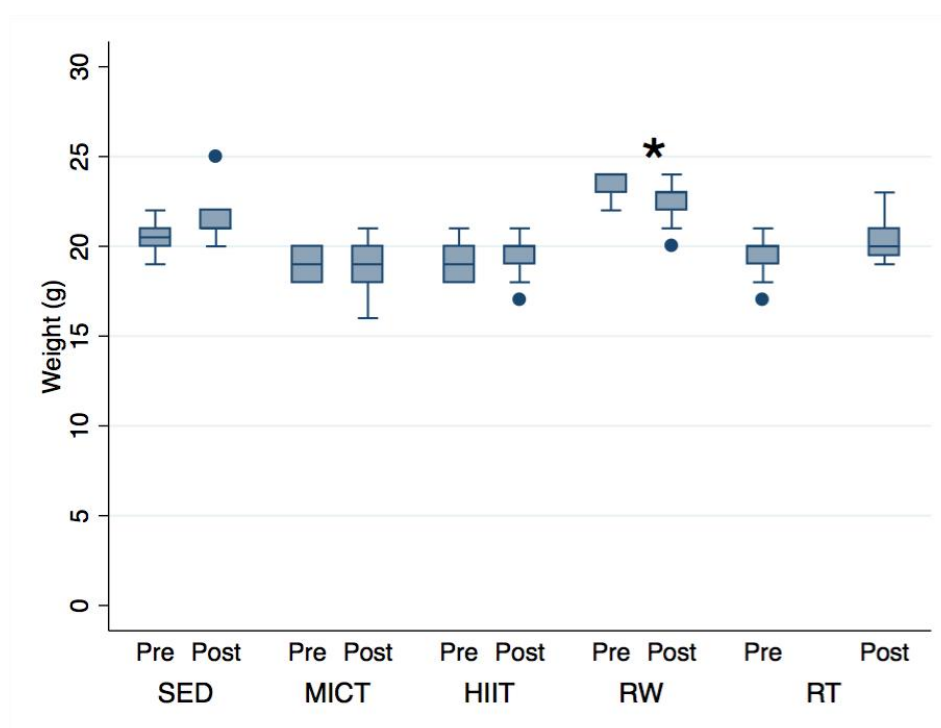


Figure 3. Mean mice body weight among groups and from-to-post-intervention. SED: sedentary group; MICT: moderate-intensity continuous training; HIIT: high-intensity interval training; RW: running wheel; RT: resistance training. Differences were verified using paired T test. *: $p=0.035$ comparing post intervention to baseline.

MICT and HIIT groups did not present a treadmill-induced reduction on locomotor activity compared to SED, showing that the equipment and exercise protocols did not affect mobility among animals from those groups.

MRCT was performed before and after 6-week intervention period in MICT and HIIT groups. The difference on maximum speed achieved at baseline and post intervention was not significant at both groups (Figure 4; MICT: $p=0.279$;

HIIT: $p=0.578$). Likewise, there was no difference on maximum speed at post intervention period among groups ($p=0.246$).

On the other hand, the maximum weight loaded by mice in RT group was significantly increased after each week of study until 6th week ($p<0.001$). Regarding RW group, the weekly mean distance covered by mice ($F=0.636$; $p=0.673$) and mean velocity achieved at running wheel ($F=0.695$; $p=0.628$) was not different throughout the six weeks intervention. Furthermore, mice from RW group showed higher total distance covered during the 6-week intervention period comparing to HIIT group ($p<0.001$) but no MICT ($p=0.11$).

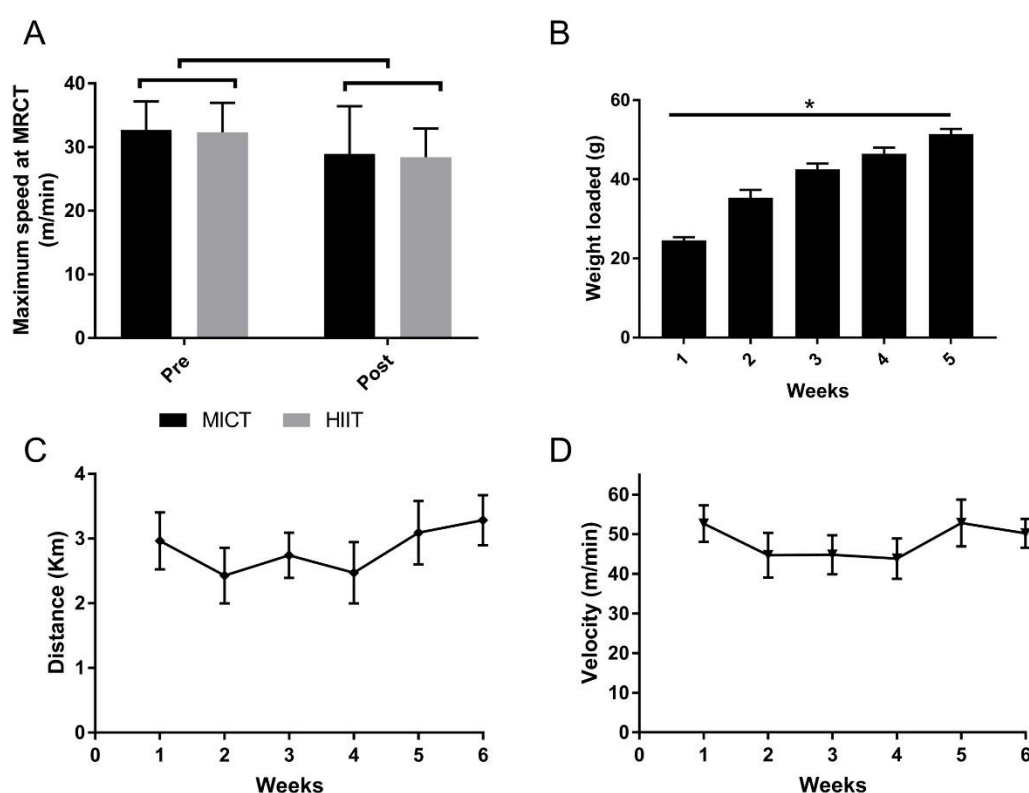


Figure 4. Data about maximum running capacity test (MRCT) (A), maximum weight loaded by mice on RT group (B), and mean distance (C) and velocity (D) during 6-week intervention period from RW group. Differences were verified using T test (A) and ANOVA (B, C and D). Values expressed at mean (SE). * $p<0.001$ for difference comparing all weeks with each other.

3.1. Moderate-intensity continuous training and resistance training improved recognition and spatial memory

MICT mice exhibited an enhanced recognition memory compared to SED mice ($p=0.046$) and other exercised groups ($F_{(4,68)}=3.32$; HIIT: $p<0.001$; RW: $p=0.003$; RT: $p<0.001$). Nonetheless, RW activity appeared to improve object recognition index compared to RT ($p=0.045$). On the other hand, mice at RT group spent significant more time at novel arm at Y-maze test compared to SED ($p=0.004$), MICT ($p=0.019$) and RW ($p=0.003$) groups, showing in an exercise-induced improvement on spatial memory.

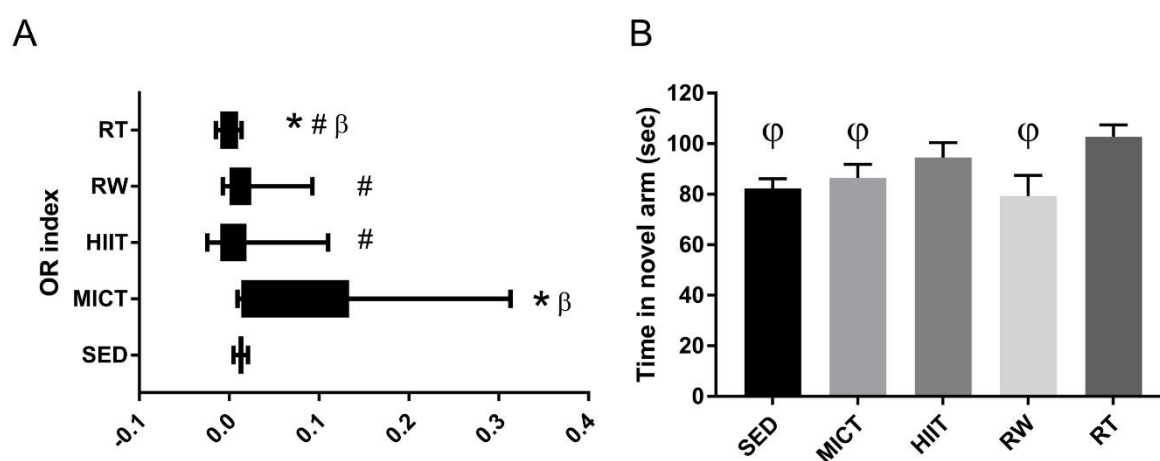


Figure 5. Data from (A) object recognition (OR) and (B) Y-maze test. SED: sedentary group; MICT: moderate-intensity continuous training; HIIT: high-intensity interval training; RW: running wheel; RT: resistance training. Differences were verified using Kruskal-Wallis (A) and ANOVA (B). * $p<0.05$ compared to SED; # $p<0.05$ compared to MICT β : $p<0.05$ compared to RW; ϕ : $p<0.05$ compared to RT

3.2. Benefit of physical exercise and physical activity on reduction of nitrite at hippocampus is independent of training model.

Figure 6 reported that ROS was increased cerebral cortex in RT group ($F_{(4,29)}=5.36$; $p<0.001$; Figure 7A) compared to all groups. RT showed the lowest lipid peroxidation level among groups ($F_{(4,51)}=6.97$; $p<0.001$; Figure 7D). Conversely, RW presented an activity-induced increasing in TBARS level compared to SED. No significant difference was evidenced in sulfhydryl content ($F_{(4,29)}=1.61$; $p=0.199$; Figure 7C) and ROS levels ($F_{(4,29)}=2.08$; $p=0.109$; Figure 7B) among groups. Regarding antioxidant enzymes, RW showed the highest level of CAT activity (Figure 7E) among all groups ($F_{(4,29)}=12.08$; $p<0.001$), while RT reduced SOD activity (Figure 7F) compared to MICT ($F_{(4,29)}=3.38$; $p=0.022$).

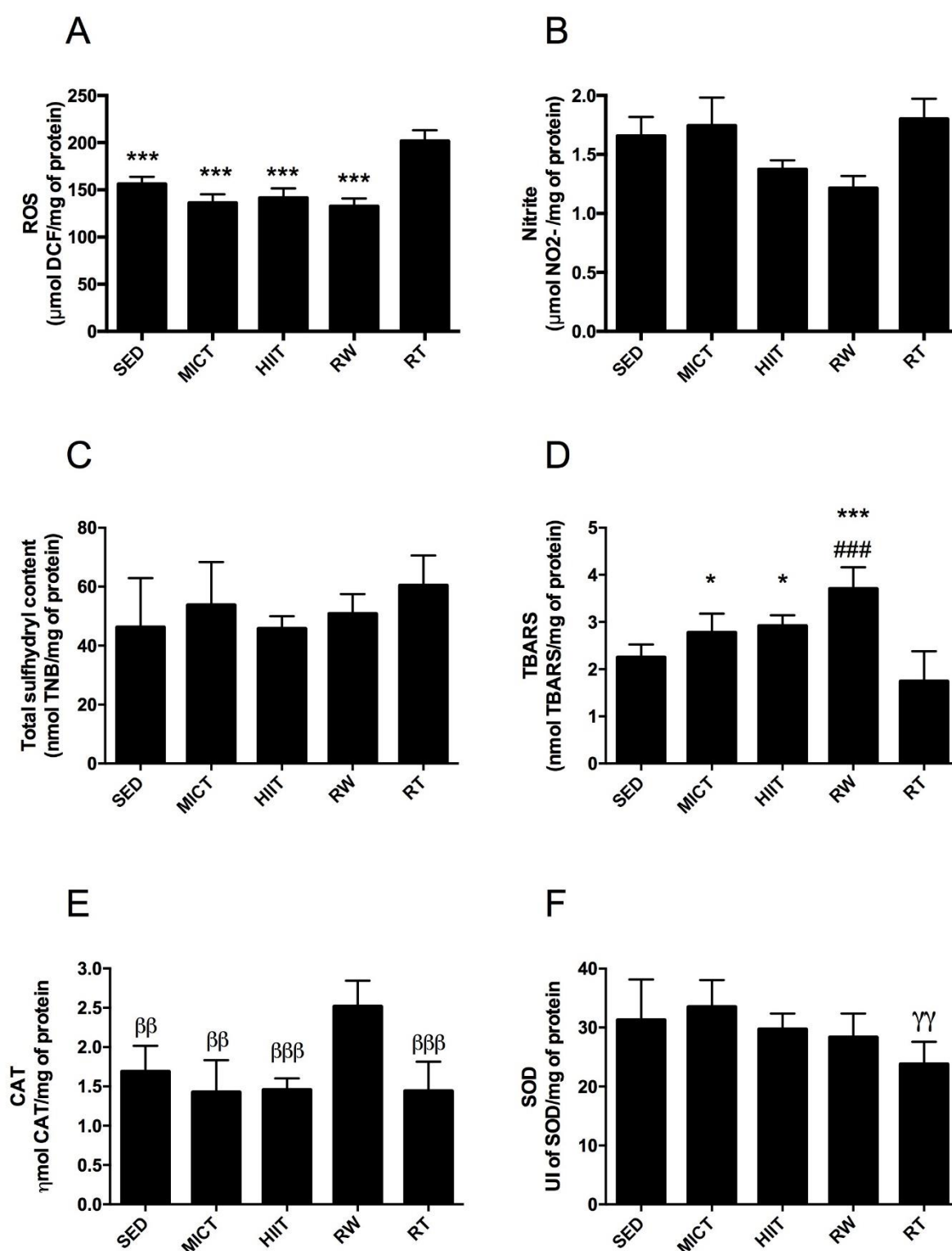


Figure 6. Effects of 6-week intervention on reactive oxygen species level (A); nitrite level (B); sulfhydryl content (C); TBARS level (D); catalase activity (E); and superoxide dismutase activity (F) in the cerebral cortex of C57BL/6 female mice. Differences were verified using ANOVA. Data are reported as means $\pm$ SE. *Denotes significant difference from the RT group

for $p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. #Denotes significant difference from the SED group for $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$. β Denotes significant difference from the RW group for $p < 0.05$, $\beta\beta$ $p < 0.01$, $\beta\beta\beta$ $p < 0.001$. γ Denotes significant difference from the MICT group for $p < 0.05$, $\gamma\gamma$ $p < 0.01$.

Figure 7 shows the model-independent protective effect of physical activity (running wheel) and exercise training on oxidative stress at hippocampus. Sedentary mice exhibited higher ROS levels ($F_{(4,54)} = 2.641$; $p = 0.043$; Figure 6B). However, free running wheel (RW), continuous moderate (MICT), intermittent exhaustive (HIIT), and resistance (RT) training models reduced the levels of this reactive species. Likewise, ROS levels were reduced in RW mice (79.64 ± 4.9 ; Figure 6A). RT lead to a significant increase in both TBARS ($F_{(4,51)} = 3.66$; $p = 0.01$; Figure 6D) and ROS ($F_{(4,29)} = 25.45$; $p < 0.001$; Figure 6A) levels compared to SED. Indeed, ROS levels in RT was the highest among groups. There was not significant difference in sulfhydryl content among groups ($F_{(4,29)} = 0.20$; $p = 0.93$; Figure 6C). Regarding antioxidant enzymes, it was observed that MICT promoted an increasing in CAT activity ($F_{(4,29)} = 5.36$; $p = 0.002$; Figure 6E). On the other hand, SOD activity (Figure 6F) was diminished at RT comparing to MICT and HIIT ($F_{(4,20)} = 4.69$; $p = 0.008$).

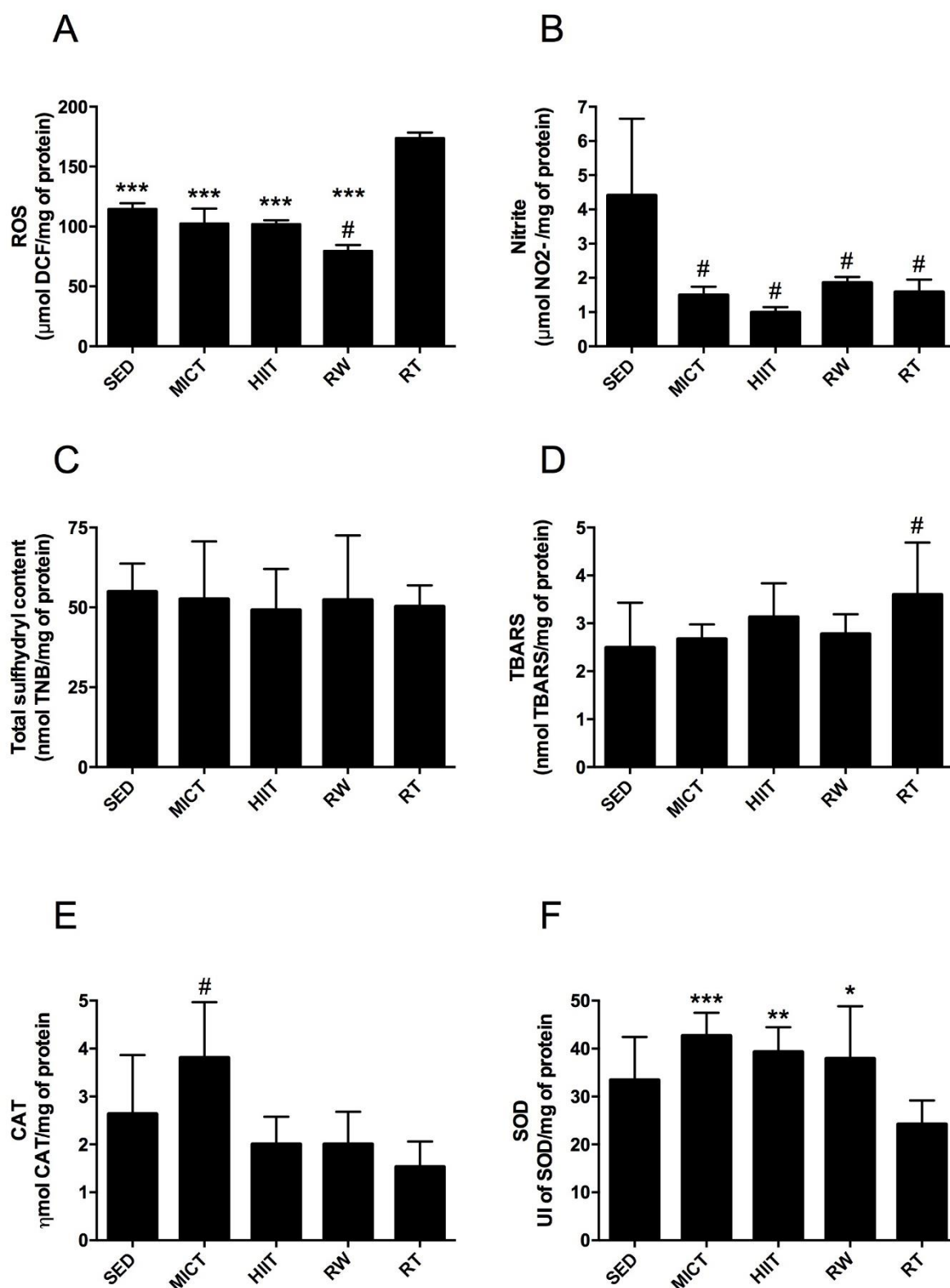


Figure 7. Effects of 6-week intervention on reactive oxygen species level (A); nitrite level (B); sulfhydryl content (C); TBARS level (D); catalase activity (E); and superoxide dismutase activity (F) in the hippocampus of C57BL/6 female mice. Data are reported as means ± SE. Differences were verified using ANOVA. *Denotes significant difference from the RT group

for $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. #Denotes significant difference from the SED group for $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$.

In cerebral cortex (Figure 8A), AChE activity was higher in RT compared to SED, MICT and RW groups ($F_{(4,29)} = 2.90$; $p = 0.039$). There was no significant difference on AChE at hippocampus ($F_{(4,29)} = 0.45$; $p = 0.772$; Figure 8B).

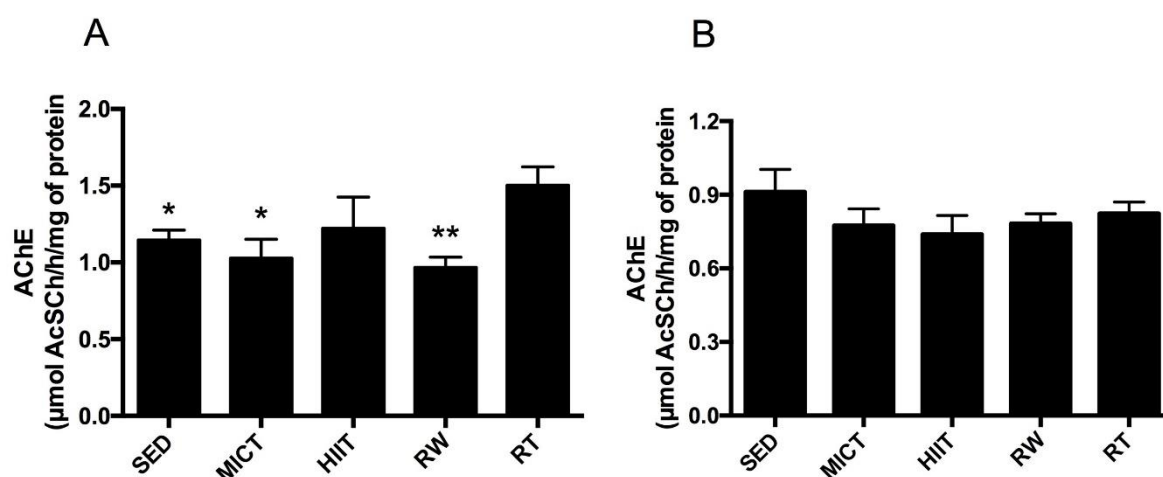


Figure 8. Effects of 6-week intervention on acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B) in C57BL/6 female mice. Data are reported as means $\pm$ SE. Differences were verified using ANOVA. *Denotes significant difference from the RT group for $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4. Discussion

The present study investigated the effects of physical activity and different physical training models on memory, activity of acetylcholinesterase, and oxidative stress markers in the cerebral cortex and hippocampus. Recent research has sustained the benefit of physically active life style on neuroplasticity and memory function[44–46]. Conversely, randomized controlled trial in older humans indicated this exercise-induced memory improvements was variable[47]. Understanding the possible mechanisms that explained this variability is relevant for tailored clinical prescriptions of exercise interventions.

Our findings indicated that moderate-intensity continuous training and resistance training could impact oxidative parameters in hippocampus and cerebral cortex, reflecting at recognition and spatial memory. These structures

are involved in memory function, with the perirhinal cortex most strongly related to object recognition after short intervals and the hippocampus associated with spatial memory[48]. Moreover, the septum has cholinergic projections on to cortical regions and the hippocampus, which are also involved in memory acquisition, and it is suggested that disturbances on these connections alter memory consolidation[49].

Continuous MICT was able to improve recognition memory compared to sedentary and each other groups. Similar exercise-induced improvement in learning and memory had been reported in studies with both human[50–54] and animal sample[55,56]. Indeed, Aguiar et al.[56] suggested that even single bouts of continuous moderate-intensity exercise training could improve memory in aged rats. In humans, MICT seems to increase memory in patients with cognitive impairment[51,57], stress-related exhaustion[58], depressive and schizophrenia[59] besides healthy subjects[52,60]. For those reasons, this model of physical exercise has been suggested as a non-pharmacological neuroprotection strategy essentially by inducing new neurons formation (neurogenesis)[61] and increasing in growth and neurotrophic factors[9,62].

In addition, RT was the only group presenting better spatial memory compared to sedentary group. Also, RT augmented acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex compared to other groups but no HIIT. AChE activity appears to have a pivotal role in memory consolidation[49,63–65]. In 1999, Hasselmo [49] hypothesized that while high levels of acetylcholine (ACh) is appropriate to encoding of new memories, low levels of ACh lead by increased AChE activity are essential for memory consolidation. As result, it would facilitate feedback connections and strengthening of representations within the hippocampus itself or within the entorhinal cortex [49,66,67].

Our results showed changes in oxidative stress parameters in the cerebral cortex and hippocampus after 6 weeks of intervention. Administration of streptozotocin induces an animal model of Alzheimer's disease, promoting multiple alterations similar to those found in patients with AD, such as ROS and reactive nitrogen species (RNS), induced oxidative stress and depletion of antioxidant systems [68]. Further, upregulation of inducible nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase protein may be an enzymatic source of the elevated nitrite level in hippocampus in sedentary animals with AD model or not.

Once expressed, iNOS produces constantly a high level of nitric oxide (NO), having a toxic effect on neurons[69]. Moreover, the excess of superoxide (O_2^-) can react rapidly with NO, producing peroxynitrite ($ONOO^-$), which reacts with several biological molecules promoting damage and neuronal cell death[70–72]. The results here exposed indicate a down-regulation of nitrite level on hippocampus. This improvement was independent of exercise model, acting as a neuroprotector non-pharmacological treatment.

ROS was increased in RT at both cerebral cortex and hippocampus. Paradoxically, such molecules have a key role in skeletal muscle adaptation associated with physical exercise[73], although its up-regulation have been related to aging and sarcopenia. The exercise-induced growth of ROS levels may be explained by elevated formation of NADPH oxidase contributing to a larger extent of cytosolic O_2^- than mitochondria [73]. This up-regulation lead to activation of MAPK/ERK pathway that act to facilitate cellular effects that influence synaptic plasticity, such as increasing in brain derived neurotrophic factor (BDNF)[73,74]. Thus, quantifying the impact of each exercise parameter on radical species may be a crucial step in determining the best exercise model for optimizing brain structure and function[75].

In this study, lipid peroxidation demonstrated by the TBARS content was significantly increased at cerebral cortex and hippocampus in mice from RW and RT groups, respectively. SOD catalyzes the dismutation of O_2^- to H_2O_2 , which can be neutralized considering the action of other enzymes such as CAT and GPX[76]. Otherwise, decrease in SOD, CAT, and GPX activities may impair O_2^- and H_2O_2 removal and this can generate hydroxyl radicals and lipid peroxidation, triggering alterations in the biological properties of membranes[77]. Cerebral cortex of RW mice presented high TBARS content, which was compensated by increased CAT activity. Likewise, in hippocampus, RW was able to augment SOD activity and then leading ROS level of this group to the lowest of all groups. Still on RW group, only animals from it showed weight loss comparing pre and post intervention period. However, the same group reported a higher weight at baseline measurements. This baseline difference was no expected seems there is generally little genetic difference among mice from inbred lines[78].

Likewise, although RT showed an increased ROS levels, this training model presented a low TBARS content in cerebral cortex. These findings suggest that

RT promoted a different antioxidant response. The increased ROS-induced H_2O_2 content on cerebral cortex could be controlled, perhaps, through action of glutathione peroxidases (GPX). GPX catalyzes the reduction of H_2O_2 and lipid peroxides utilizing GSH as an electron donor[5,79]. In the brain tissue, this action is primarily performed by GPX1, one of the major antioxidant enzymes in the brain. Besides GPX activity is reduced in hippocampus and frontal cortex in NDD, its upregulation specially by moderate-to-high intensity exercise[80,81] could be one of the protective responses against neuronal injury[82], showing that, probably, this model of physical exercise could increase its activity.

Furthermore, moderate-intensity continuous training lead to improvement in antioxidant defense. This finding not only corroborates with literature[83–86] as explained MICT as a potential non-pharmacological strategy of neuroprotection. Based on our results, it is possible to understand why this model of physical exercise is widely recommended for prevention and treatment of NDD. In the AD brain, imbalances in homeostasis lead to the increase of ROS and lipid peroxidation, resulting in oxidative stress and damage[87,88], and cognitive deficits[6,87,89,90]. Therefore, interventions avoiding or reducing oxidative stress or increasing antioxidant defenses are of interest in conditions of AD/A β neurotoxicity. Here we show that MICT increased CAT level at hippocampus compared to sedentary group. As result, it was the only group which improved recognition memory, that is strictly related to hippocampus[9,91]. In addition, while MICT increased antioxidative protection at hippocampus, RT presented TBARS content higher than sedentary animals. The interest point is that MICT and RT were the groups which OR index was significantly different compared to SED: while OR memory was increased by MICT, RT decreased it. These findings linking TBARS/CAT results to the OR memory suggest that decreased lipid peroxidation/higher antioxidant activity in hippocampus lead respectively to memory deterioration or development.

Additionally, mice that performed RT showed better spatial memory than sedentary control group. As mentioned before, RT exhibited high ROS level in cerebral cortex and hippocampus. Also, there is a body of evidence linking this type of training with up-regulation of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and improved cognitive function[48,92–96]. The key points are: i) IGF-1 appears to be related to GPX regulation but no SOD or CAT [97], ii) ROS play an essential

function in the signaling and biological action of IGF-I in myocytes[98], insulin regulation[99] and other tissues[100], and iii) RT appears to have incremental effect on memory and cognitive function specially by IGF-1 augment[8,9]. Based on literature and on data from the present study, we hypothesis that RT lead to controlled production of ROS, stimulating IGF-1 signaling. Then, IGF-1 could act as both an antioxidant protector factor by GPX activity, especially on cerebral cortex, and neurotrophic factor on hippocampus[9] resulting in improvement on spatial memory.

In summary, we show that nitrite level was decreased at hippocampus in intervention groups regardless activity or exercise model. Likewise, MICT improved recognition memory besides increased CAT activity. Although RT showed elevated ROS and TBARS content at hippocampus, it could enhance spatial memory. Although further research is needed to elucidate the effects/mechanisms by which RT manipulates spatial memory, specially considering GPX measurements, we conclude that continuous moderate-intensity training and resistance training protocols seem to act as oxidative stress regulators and non-pharmacological strategies to improve cognitive function.

Disclosure statement

The authors have nothing to disclose.

5. Reference

- [1] J.T. Coyle, P. Puttfarcken, Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders, *Science* (80-.). 262 (1993) 689–695.
- [2] M.T. Lin, M.F. Beal, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases., *Nature*. 443 (2006) 787–795. doi:10.1038/nature05292.
- [3] A. Federico, E. Cardaioli, P. Da Pozzo, P. Formichi, G.N. Gallus, E. Radi, Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration, *J. Neurol. Sci.* 322 (2012) 254–262.
- [4] D.A. Patten, M. Germain, M.A. Kelly, R.S. Slack, Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration, *J. Alzheimer's Dis.* 20 (2010) S357–S367.
- [5] S. Gandhi, A.Y. Abramov, Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012 (2012).
- [6] D.A. Butterfield, A. Castegna, C.M. Lauderback, J. Drake, Evidence that

- amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death, *Neurobiol. Aging*. 23 (2002) 655–664.
- [7] K. Hensley, M.L. Maidt, Z. Yu, H. Sang, W.R. Markesbery, R.A. Floyd, Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation, *J. Neurosci.* 18 (1998) 8126–8132.
 - [8] R.C. Cassilhas, V.A.R. Viana, V. Grassmann, R.T. Santos, R.F. Santos, S. Tufik, M.T. Mello, The impact of resistance exercise on the cognitive function of the elderly, *Med. Sci. Sport. Exerc.* 39 (2007) 1401–1407.
 - [9] R.C. Cassilhas, K.S. Lee, J. Fernandes, M.G.M. Oliveira, S. Tufik, R. Meeusen, M.T. De Mello, Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms, *Neuroscience*. 202 (2012) 309–317.
 - [10] L.R. Squire, N.F. Dronkers, J. V Baldo, *Encyclopedia of neuroscience*, Elsevier, 2009.
 - [11] P. Jolicoeur, C. Lefebvre, J. Martinez-Trujillo, *Mechanisms of Sensory Working Memory: Attention and Performance XXV*, Academic Press, 2015.
 - [12] M.S. Nokia, S. Lensu, J.P. Ahtinen, P.P. Johansson, L.G. Koch, S.L. Britton, H. Kainulainen, Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained, *J. Physiol.* 594 (2016) 1855–1873.
 - [13] M.-C. Gomez-Cabrera, E. Domenech, J. Viña, Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training, *Free Radic. Biol. Med.* 44 (2008) 126–131.
 - [14] M.A. Bouzid, E. Filaire, R. Matran, S. Robin, C. Fabre, Lifelong Voluntary Exercise Modulates Age-Related Changes in Oxidative Stress., *Int. J. Sports Med.* 39 (2018) 21–28. doi:10.1055/s-0043-119882.
 - [15] A. Thirupathi, R.A. Pinho, Effects of reactive oxygen species and interplay of antioxidants during physical exercise in skeletal muscles, *J. Physiol. Biochem.* (2018) 1–9.
 - [16] N.T. Lautenschlager, K.L. Cox, Can participation in mental and physical activity protect cognition in old age?: Comment on “The Mental Activity and eExercise (MAX) trial: a randomized controlled trial to enhance cognitive function in older adults,” *JAMA Intern. Med.* 173 (2013) 805–806.
 - [17] F. Sofi, D. Valecchi, D. Bacci, R. Abbate, G.F. Gensini, A. Casini, C. Macchi, Physical activity and risk of cognitive decline: a meta- analysis of prospective studies, *J. Intern. Med.* 269 (2011) 107–117.
 - [18] C. Niemann, B. Godde, C. Voelcker-Rehage, Not only cardiovascular, but also coordinative exercise increases hippocampal volume in older adults, *Front. Aging Neurosci.* 6 (2014) 170.
 - [19] L.F. Ten Brinke, N. Bolandzadeh, L.S. Nagamatsu, C.L. Hsu, J.C. Davis, K. Miran-Khan, T. Liu-Ambrose, Aerobic exercise increases hippocampal volume in older women with probable mild cognitive impairment: a 6-month randomised controlled trial, *Br J Sport. Med.* (2014) bjsports-2013.
 - [20] S. Rovio, G. Spulber, L.J. Nieminen, E. Niskanen, B. Winblad, J. Tuomilehto, A. Nissinen, H. Soininen, M. Kivipelto, The effect of midlife physical activity on structural brain changes in the elderly, *Neurobiol. Aging*. 31 (2010) 1927–1936.

- [21] K.I. Erickson, C.A. Raji, O.L. Lopez, J.T. Becker, C. Rosano, A.B. Newman, H.M. Gach, P.M. Thompson, A.J. Ho, L.H. Kuller, Physical activity predicts gray matter volume in late adulthood The Cardiovascular Health Study, *Neurology*. 75 (2010) 1415–1422.
- [22] L. Garrett, D.C. Lie, M.H. De Angelis, W. Wurst, S.M. Hölter, Voluntary wheel running in mice increases the rate of neurogenesis without affecting anxiety-related behaviour in single tests, *BMC Neurosci*. 13 (2012) 61.
- [23] K. Van der Borght, D.É. Kóbor- Nyakas, K. Klauke, B.J.L. Eggen, C. Nyakas, E.A. Van der Zee, P. Meerlo, Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis, *Hippocampus*. 19 (2009) 928–936.
- [24] I. Heinla, J. Åhlgren, E. Vasar, V. Voikar, Behavioural characterization of C57BL/6N and BALB/c female mice in social home cage—Effect of mixed housing in complex environment, *Physiol. Behav*. 188 (2018) 32–41.
- [25] V. Schefer, M.I. Talan, Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity, *Exp. Gerontol*. 31 (1996) 387–392.
- [26] T.A. Hornberger Jr, R.P. Farrar, Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat, *Can. J. Appl. Physiol*. 29 (2004) 16–31.
- [27] M.E. Afzalpour, H.T. Chadorneshin, M. Foadoddini, H.A. Eivari, Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain, *Physiol. Behav*. 147 (2015) 78–83.
- [28] K. Bailey, J. Crawley, Anxiety-Related Behaviors in Mice, in: J.J. Buccafusco (Ed.), *Methods Behav. Anal. Neurosci.*, 2nd ed., CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), USA, 2009. doi:NBK5228 [bookaccession].
- [29] B. KJ, L. H, P. G, S. MA, C. G., Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations., in: J.J. Buccafusco (Ed.), *Methods Behav. Anal. Neurosci.*, 2nd ed., CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL), USA, 2009.
- [30] F.B. Carvalho, J.M. Gutierrez, A. Bueno, P. Agostinho, A.M. Zago, J. Vieira, P. Frühauf, J.L. Cechella, C.W. Nogueira, S.M. Oliveira, Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide, *Mol. Neurobiol*. 54 (2017) 3350–3367.
- [31] Y. Fu, Y. Chen, L. Li, Y. Wang, X. Kong, J. Wang, Food restriction affects Y-maze spatial recognition memory in developing mice., *Int. J. Dev. Neurosci*. 60 (2017) 8–15. doi:10.1016/j.ijdevneu.2017.03.010.
- [32] M. Ayachi, R. Niel, I. Momken, V.L. Billat, L. Mille-Hamard, Validation of a Ramp Running Protocol for Determination of the True VO₂max in Mice , *Front. Physiol*. . 7 (2016) 372. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2016.00372>.
- [33] 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.
- [34] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem*. 72 (1976) 248–254.

- [35] G.L. ELLMAN, K.D. COURTNEY, V.J. ANDRES, R.M. FEATHER-STONE, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity., *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88–95.
- [36] S.F. Ali, C.P. LeBel, S.C. Bondy, Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity., *Neurotoxicology.* 13 (1992) 637–648.
- [37] W.-C. Huang, Y.-S. Lin, C.-Y. Wang, C.-C. Tsai, H.-C. Tseng, C.-L. Chen, P.-J. Lu, P.-S. Chen, L. Qian, J.-S. Hong, C.-F. Lin, Glycogen synthase kinase-3 negatively regulates anti-inflammatory interleukin-10 for lipopolysaccharide-induced iNOS/NO biosynthesis and RANTES production in microglial cells., *Immunology.* 128 (2009) e275-86. doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02959.x.
- [38] H. Esterbauer, K.H. Cheeseman, Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal., *Methods Enzymol.* 186 (1990) 407–421.
- [39] M.Y. Aksenov, W.R. Markesbery, Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease., *Neurosci. Lett.* 302 (2001) 141–145.
- [40] H.P. Misra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase., *J. Biol. Chem.* 247 (1972) 3170–3175.
- [41] H. Aebi, Catalase in vitro., *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [42] S. Stata, Release 13. Statistical software, StataCorp LP, Coll. Station. TX. (2013).
- [43] G. Prism, Graphpad software, San Diego, CA, USA. (1994).
- [44] M. Hashimoto, Y. Araki, Y. Takashima, K. Nogami, A. Uchino, T. Yuzuriha, H. Yao, Hippocampal atrophy and memory dysfunction associated with physical inactivity in community- dwelling elderly subjects: The Sefuri study, *Brain Behav.* 7 (2017).
- [45] R.J. Dougherty, S.A. Schultz, T.K. Kirby, E.A. Boots, J.M. Oh, D. Edwards, C.L. Gallagher, C.M. Carlsson, B.B. Bendlin, S. Asthana, Moderate physical activity is associated with cerebral glucose metabolism in adults at risk for Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* 58 (2017) 1089–1097.
- [46] I.-F. Shih, K. Paul, M. Haan, Y. Yu, B. Ritz, Physical activity modifies the influence of apolipoprotein E ϵ 4 allele and type 2 diabetes on dementia and cognitive impairment among older Mexican Americans, *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* 14 (2018) 1–9.
- [47] E. Duzel, H. Van Praag, M. Sendtner, Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function?, *Brain.* 139 (2016) 662–673. doi:10.1093/brain/awv407.
- [48] J. Fernandes, J.C.K. Soares, L.G.Z. do Amaral Balieiro, R.M. Arida, A single bout of resistance exercise improves memory consolidation and increases the expression of synaptic proteins in the hippocampus, *Hippocampus.* 26 (2016) 1096–1103.
- [49] M.E. Hasselmo, Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation, *Trends Cogn. Sci.* 3 (1999) 351–359.
- [50] Y.K. Jeon, C.H. Ha, The effect of exercise intensity on brain derived neurotrophic factor and memory in adolescents, *Environ. Health Prev. Med.* 22 (2017) 27.

- [51] L.S. Nagamatsu, A. Chan, J.C. Davis, B.L. Beattie, P. Graf, M.W. Voss, D. Sharma, T. Liu-Ambrose, Physical activity improves verbal and spatial memory in older adults with probable mild cognitive impairment: a 6-month randomized controlled trial, *J. Aging Res.* 2013 (2013).
- [52] J. Young, M. Angevaren, J. Rusted, N. Tabet, Aerobic exercise to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment, *Cochrane Libr.* (2015).
- [53] C. Tonoli, E. Heyman, B. Roelands, L. Buyse, F. Piacentini, S. Berthoin, S. Bailey, N. Pattyn, R. Meeusen, BDNF, IGF-I, glucose and insulin during continuous and interval exercise in type 1 diabetes, *Int. J. Sports Med.* 36 (2015) 955–959.
- [54] V. Pieramico, R. Esposito, S. Cesinaro, V. Frazzini, S.L. Sensi, Effects of non-pharmacological or pharmacological interventions on cognition and brain plasticity of aging individuals, *Front. Syst. Neurosci.* 8 (2014) 153.
- [55] C.K. Barha, G.R. Hsiung, J.R. Best, J.C. Davis, J.J. Eng, C. Jacova, P.E. Lee, M. Munkacsy, W. Cheung, T. Liu-Ambrose, Sex Difference in Aerobic Exercise Efficacy to Improve Cognition in Older Adults with Vascular Cognitive Impairment: Secondary Analysis of a Randomized Controlled Trial, *J Alzheimers Dis.* 60 (2017) 1397–1410. doi:10.3233/jad-170221.
- [56] A.S. Aguiar Jr, A.A. Castro, E.L. Moreira, V. Glaser, A.R.S. Santos, C.I. Tasca, A. Latini, R.D.S. Prediger, Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling, *Mech. Ageing Dev.* 132 (2011) 560–567.
- [57] K. Sugano, M. Yokogawa, S. Yuki, C. Dohmoto, M. Yoshita, T. Hamaguchi, D. Yanase, K. Iwasa, K. Komai, M. Yamada, Effect of cognitive and aerobic training intervention on older adults with mild or no cognitive impairment: a derivative study of the nakajima project, *Dement. Geriatr. Cogn. Dis. Extra.* 2 (2012) 69–80.
- [58] T. Eskilsson, L.S. Järholm, H.M. Gavelin, A.S. Neely, C.-J. Boraxbekk, Aerobic training for improved memory in patients with stress-related exhaustion: a randomized controlled trial, *BMC Psychiatry.* 17 (2017) 322.
- [59] V. Oertel-Knöchel, P. Mehler, C. Thiel, K. Steinbrecher, B. Malchow, V. Tesky, K. Ademmer, D. Prvulovic, W. Banzer, Y. Zopf, Effects of aerobic exercise on cognitive performance and individual psychopathology in depressive and schizophrenia patients, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 264 (2014) 589–604.
- [60] C. Fabre, K. Chamari, P. Mucci, J. Masse-Biron, C. Prefaut, Improvement of cognitive function by mental and/or individualized aerobic training in healthy elderly subjects, *Int. J. Sports Med.* 23 (2002) 415–421.
- [61] K.I. Erickson, M.W. Voss, R.S. Prakash, C. Basak, A. Szabo, L. Chaddock, J.S. Kim, S. Heo, H. Alves, S.M. White, Exercise training increases size of hippocampus and improves memory, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 3017–3022.
- [62] K.L. Szuhany, M. Bugatti, M.W. Otto, A meta-analytic review of the effects of exercise on brain-derived neurotrophic factor, *J. Psychiatr. Res.* 60 (2015) 56–64.
- [63] G. Pepeu, M.G. Giovannini, Cholinesterase inhibitors and memory, *Chem. Biol. Interact.* 187 (2010) 403–408.

- [64] G.R. Dawson, S.D. Iversen, The effects of novel cholinesterase inhibitors and selective muscarinic receptor agonists in tests of reference and working memory, *Behav. Brain Res.* 57 (1993) 143–153.
- [65] F.M. Inglis, J.C. Day, H.C. Fibiger, Enhanced acetylcholine release in hippocampus and cortex during the anticipation and consumption of a palatable meal, *Neuroscience*. 62 (1994) 1049–1056.
- [66] M. Salkovic-Petrisic, A. Knezovic, S. Hoyer, P. Riederer, What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research, *J. Neural Transm.* 120 (2013) 233–252.
- [67] T. Darreh-Shori, E. Hellstrom-Lindahl, C. Flores-Flores, Z.Z. Guan, H. Soreq, A. Nordberg, Long-lasting acetylcholinesterase splice variations in anticholinesterase-treated Alzheimer's disease patients., *J. Neurochem.* 88 (2004) 1102–1113.
- [68] P.K. Kamat, A. Kalani, S. Rai, S.K. Tota, A. Kumar, A.S. Ahmad, Streptozotocin intracerebroventricular-induced neurotoxicity and brain insulin resistance: A therapeutic intervention for treatment of sporadic Alzheimer's disease (sAD)-like pathology, *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) 4548–4562.
- [69] C. Rendeiro, J.S. Rhodes, J.P.E. Spencer, The mechanisms of action of flavonoids in the brain: direct versus indirect effects, *Neurochem. Int.* 89 (2015) 126–139.
- [70] S. Tota, H. Awasthi, P.K. Kamat, C. Nath, K. Hanif, Protective effect of quercetin against intracerebral streptozotocin induced reduction in cerebral blood flow and impairment of memory in mice, *Behav. Brain Res.* 209 (2010) 73–79.
- [71] A.S. Darvesh, R.T. Carroll, A. Bishayee, W.J. Geldenhuys, C.J. Van der Schyf, Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents, *Expert Rev. Neurother.* 10 (2010) 729–745.
- [72] B. Halliwell, Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?, *J. Neurochem.* 97 (2006) 1634–1658.
- [73] F. He, J. Li, Z. Liu, C.-C. Chuang, W. Yang, L. Zuo, Redox mechanism of reactive oxygen species in exercise, *Front. Physiol.* 7 (2016) 486.
- [74] M.D. Wyk, On the Nomenclature of the Somatomedins and Insulin-Like Growth Factors, (1987).
- [75] S.J.E. Lucas, J.D. Cotter, P. Brassard, D.M. Bailey, High-intensity interval exercise and cerebrovascular health: curiosity, cause, and consequence, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 35 (2015) 902–911.
- [76] M. Mancuso, F. Coppede, L. Migliore, G. Siciliano, L. Murri, Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration, *J. Alzheimer's Dis.* 10 (2006) 59–73.
- [77] G.H. Kim, J.E. Kim, S.J. Rhie, S. Yoon, The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Exp. Neurobiol.* 24 (2015) 325–340.
- [78] V.B.V. Lapchik, V.G. de M. Mattaraia, G.M. Ko, Cuidados e manejo de animais de laboratório, in: *Cuid. e Manejo Animais Laboratório*, 2009.
- [79] K. Dasuri, L. Zhang, J.N. Keller, Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis, *Free Radic. Biol. Med.* 62 (2013) 170–185.
- [80] S.K. Powers, D. Criswell, J. Lawler, L.L. Ji, D. Martin, R.A. Herb, G. Dudley, Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity

- in rat skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 266 (1994) R375–R380.
- [81] G. Fisher, D.D. Schwartz, J. Quindry, M.D. Barberio, E.B. Foster, K.W. Jones, D.D. Pascoe, Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise, *J. Appl. Physiol.* 110 (2010) 730–737.
 - [82] J.H.T. Power, P.C. Blumbergs, Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies, *Acta Neuropathol.* 117 (2009) 63–73.
 - [83] H. Miyazaki, S. Oh-ishi, T. Ookawara, T. Kizaki, K. Toshinai, S. Ha, S. Haga, L.L. Ji, H. Ohno, Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise, *Eur. J. Appl. Physiol.* 84 (2001) 1–6.
 - [84] M. Gul, B. Demircan, S. Taysi, N. Oztasan, K. Gumustekin, E. Siktar, M.F. Polat, S. Akar, F. Akcay, S. Dane, Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart, *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 143 (2006) 239–245.
 - [85] C. Vanzella, J.D. Neves, A.F. Vizuete, D. Aristimunha, J. Kolling, A. Longoni, C.A.S. Gonçalves, A.T.S. Wyse, C.A. Netto, Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats, *Behav. Brain Res.* 334 (2017) 78–85.
 - [86] K. Azizbeigi, S.R. Stannard, S. Atashak, M.M. Haghighi, Antioxidant enzymes and oxidative stress adaptation to exercise training: comparison of endurance, resistance, and concurrent training in untrained males, *J. Exerc. Sci. Fit.* 12 (2014) 1–6.
 - [87] V. Chauhan, A. Chauhan, Oxidative stress in Alzheimer's disease, *Pathophysiology.* 13 (2006) 195–208.
 - [88] X. Zhu, H. Lee, G. Perry, M.A. Smith, Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.* 1772 (2007) 494–502.
 - [89] E. Mariani, M.C. Polidori, A. Cherubini, P. Mecocci, Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview, *J. Chromatogr. B.* 827 (2005) 65–75.
 - [90] L. Migliore, I. Fontana, R. Colognato, F. Coppede, G. Siciliano, L. Murri, Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases, *Neurobiol. Aging.* 26 (2005) 587–595.
 - [91] N.J. Broadbent, S. Gaskin, L.R. Squire, R.E. Clark, Object recognition memory and the rodent hippocampus, *Learn. Mem.* 17 (2010) 5–11.
 - [92] M.A.F. Singh, N. Gates, N. Saigal, G.C. Wilson, J. Meiklejohn, H. Brodaty, W. Wen, N. Singh, B.T. Baune, C. Suo, The Study of Mental and Resistance Training (SMART) study—resistance training and/or cognitive training in mild cognitive impairment: a randomized, double-blind, double-sham controlled trial, *J. Am. Med. Dir. Assoc.* 15 (2014) 873–880.
 - [93] P. Peig-Chiello, W.J. Perrig, R. Ehrensam, H.B. Staehelin, F. Krings, The effects of resistance training on well-being and memory in elderly volunteers, *Age Ageing.* 27 (1998) 469–475.

- [94] P.D. Loprinzi, E. Frith, M.K. Edwards, Resistance exercise and episodic memory function: a systematic review, *Clin. Physiol. Funct. Imaging*. (2018).
- [95] K. Soga, H. Masaki, M. Gerber, S. Ludyga, Acute and long-term effects of resistance training on executive function, *J. Cogn. Enhanc.* (2018) 1–8.
- [96] J.R. Best, B.K. Chiu, C.L. Hsu, L.S. Nagamatsu, T. Liu-Ambrose, Long-term effects of resistance exercise training on cognition and brain volume in older women: results from a randomized controlled trial, *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 21 (2015) 745–756.
- [97] Y. Higashi, A. Pandey, B. Goodwin, P. Delafontaine, Insulin-like growth factor-1 regulates glutathione peroxidase expression and activity in vascular endothelial cells: Implications for atheroprotective actions of insulin-like growth factor-1, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Basis Dis.* 1832 (2013) 391–399.
- [98] A.-E. Handayaningsih, G. Iguchi, H. Fukuoka, H. Nishizawa, M. Takahashi, M. Yamamoto, E.-H. Herningtyas, Y. Okimura, H. Kaji, K. Chihara, Reactive oxygen species play an essential role in IGF-I signaling and IGF-I-induced myocyte hypertrophy in C2C12 myocytes, *Endocrinology*. 152 (2011) 912–921.
- [99] J. Papaconstantinou, Insulin/IGF-1 and ROS signaling pathway cross-talk in aging and longevity determination, *Mol. Cell. Endocrinol.* 299 (2009) 89–100.
- [100] Y. Higashi, S. Sukhanov, A. Anwar, S.-Y. Shai, P. Delafontaine, IGF-1, oxidative stress and atheroprotection, *Trends Endocrinol. Metab.* 21 (2010) 245–254.

4. Comunicado à imprensa

Treinamento contínuo de intensidade moderada e treinamento resistido melhoram diferentes tipos de memória e regulam atividades oxidativas.

A prevalência de doenças neurodegenerativas como o Alzheimer está aumentando exponencialmente. De fato, essa foi a sexta principal causa de morte nos Estados Unidos em 2016, afetando 5,7 milhões de americanos. A doença de Alzheimer é responsável por até 80% dos casos de demência e é caracterizada principalmente pelo dano oxidativo, neuroinflamação, perda neuronal e comprometimento da aprendizagem e da memória.

Neste sentido, foi realizada uma Dissertação de Mestrado intitulada “Efeitos de diferentes modelos de exercícios físicos em parâmetros cerebrais em camundongos saudáveis”. Esse estudo objetivou identificar os efeitos do treinamento resistido, treinamento intervalado de alta intensidade, atividade física e treinamento contínuo de intensidade moderada na memória e parâmetros cerebrais em camundongos.

Foram avaliados oitenta camundongos fêmeas com 60 dias de idade; os resultados do estudo mostraram que os animais que praticaram o treinamento moderado contínuo melhoraram a memória de reconhecimento e atuou como uma estratégia antioxidante para o hipocampo. Ainda, o treinamento resistido foi capaz de melhorar a memória espacial dos camundongos. Portanto, sugere-se que a prática desses modelos de exercício físico pode ser usada como uma estratégia não-farmacológica de neuroproteção para melhora das funções cognitivas e proteção contra o dano oxidativo.

5. Anexos

ANEXO I - Documento de aprovação do estudo no Comitê de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 20 de outubro de 2017

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “Efeitos de diferentes modelos de exercícios físicos em parâmetros cerebrais em camundongos saudáveis” processo número 23110.008380/2017-35, de responsabilidade de **Airton José Rombaldi** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua complementação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 02/10/2017.

Finalidade	(X) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	21/10/2017 a 01/06/2019	
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /C57BL/6	
Nº de animais	80	
Idade	8 semanas	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Biotério Central - UFPel	

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao **COBALTO** para posterior registro no **COCEPE** (código para cadastro nº **CEEA 8380-2017**).


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____ / ____ /2017

Assinatura do Professor Responsável: _____

ANEXO II – Normas do periódico Physiology and Behavior



PHYSIOLOGY & BEHAVIOR

Official journal of the [International Behavioral Neuroscience Society](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0031-9384

DESCRIPTION

Physiology & Behavior is aimed at the causal physiological mechanisms of behavior and its modulation by environmental factors. The journal invites original reports in the broad area of behavioral and cognitive neuroscience, in which at least one variable is physiological and the primary emphasis and theoretical context are behavioral. The range of subjects includes behavioral neuroendocrinology, psychoneuroimmunology, learning and memory, ingestion, social behavior, and studies related to the mechanisms of psychopathology. Contemporary reviews and theoretical articles are welcomed and the [Editors](#) invite such proposals from interested authors. Thematic issues and more comprehensive studies are also considered for publication, subject to the same review standards and process. Articles will be published in English.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Physiologists, neurologists, psychologists, pharmacologists.

IMPACT FACTOR

2016: 2.341 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 MEDLINE®
 Chemical Abstracts
 Elsevier BIOBASE
 PsycINFO
 PsycLIT CD-ROM
 IBZ
 Nutrition Abstracts
 Energy Research Abstracts
 Energy Data Base
 Reference Update
 Current Contents/Life Sciences
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors-in-Chief

Thomas Lutz, Inst. of Veterinary Physiology, Vetsuisse Faculty & Centre for Integrative Human Physiology, Universität Zürich, Winterthurerstrasse 260, 8057, Zurich, Switzerland, Fax: +41-44-635 89 32

Section Editors

Tanja Adam, Maastricht University, Maastricht, Netherlands
 Derek Daniels, The State University of New York at Buffalo, Buffalo, New York, USA
 Kees de Graaf, Wageningen Universiteit, Wageningen, Netherlands
 Ruth Harris, Georgia Regents University, Augusta, Georgia, USA
 John Hayes, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania, USA
 Lawrence Reagan, University of South Carolina School of Medicine, Columbia, South Carolina, USA
 Kellie Tamashiro, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA
 Yvonne Ulrich-Lai, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio, USA

Managing Editor

J. Bedel, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, USA

Founding Editor

Matthew Wayner

Editorial Board

M. Baum, Boston University, Boston, Massachusetts, USA
 G.K. Beauchamp, Monell Chemical Senses Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA
 D. Begg, UNSW Australia, Sydney, New South Wales, Australia
 S. Bhatnagar, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania, USA
 D.C. Blanchard, University of Hawaii at Mānoa, Honolulu, Hawaii, USA
 R.J. Bodnar, City University of New York (CUNY), Flushing, New York, USA
 G. Boersma, John Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA
 T.W. Castonguay, University of Maryland, College Park, Maryland, USA
 L.M. Coolen, University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi, USA
 W.E. Crusio, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Bordeaux Pessac, France
 S.F. De Boer, Rijksuniversiteit Groningen, Haren, Netherlands
 C. de La Serre, University of Georgia, Athens, Georgia, USA
 T. Deak
 J.M. Dominguez, University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA
 D.A. Edwards, Emory University, Atlanta, Georgia, USA
 D.P. Figlewicz, University of Washington, Seattle, Washington, USA
 C.A. Frye, University at Albany, SUNY, Albany, New York, USA
 A. Hajnal, Pennsylvania State University, Hershey, Pennsylvania, USA
 R.J. Jandacek, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio, USA
 R.B. Kanarek, Tufts University, Medford, Massachusetts, USA
 S. Kanoski, University of Southern California, Los Angeles, California, USA
 K. Kinzig, Purdue University, West Lafayette, Indiana, USA
 J.M. Koolhaas, Rijksuniversiteit Groningen, Haren, Netherlands
 E. Krause, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
 C. Le Foll, Universität Zürich, Zurich, Switzerland

M. Lee, Swansea University, Swansea, Wales, UK
 B.S. McEwen, Rockefeller University, New York, New York, USA
 K. Myers, Bucknell University, Lewisburg, Pennsylvania, USA
 G. N. Neigh, Emory University, Atlanta, Georgia, USA
 R.J. Nelson, The Ohio State University, Columbus, OH, Ohio, USA
 J. G. Pfaus, Concordia University, Montreal, Quebec, Canada
 H. Raybould, UC Davis School of Veterinary Medicine, Davis, USA
 L. Rinaman, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
 S. Ritter, Washington State University, Pullman, Washington, USA
 R.J. Rodgers, University of Leeds, Leeds, UK
 M.F. Roitman, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA
 N.E. Rowland, University of Florida, Gainesville, Florida, USA
 N. Sachser, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster, Germany
 S. Salim, University of Houston, Houston, Texas, USA
 G.J. Schwartz
 A. Sciafani, City University of New York (CUNY), Brooklyn, New York, USA
 A. Sgoifo, Università degli Studi di Parma, Parma, Italy
 G.P. Smith
 A.C. Spector, Florida State University, Tallahassee, Florida, USA
 V. Stefanski, Universität Hohenheim, Stuttgart, Germany
 U. Stockhorst, Universität Osnabrück, Osnabrück, Germany
 R. Thunhorst, University of Iowa, Iowa City, Iowa, USA
 M. Tordoff, Monell Chemical Senses Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA
 J.G. Vandenbergh, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina, USA
 Z. Warwick, University of Maryland, Baltimore, Maryland, USA
 R.S. Weisinger, University of Melbourne, Melbourne, Australia
 M.S. Westerterp-Plantenga, University of Maastricht, Maastricht, Netherlands
 S.C. Woods, University of Cincinnati Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. To find out more, please visit the Preparation section below.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information.](#)

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is USD 2750, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public

access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

As part of the submission process your paper may be screened for English language usage and conformity to the guide for authors before it reaches the review stage. This is to ensure the journal's high standards are maintained and the review process is kept to a minimum. Passing this check is not a guarantee that your submission will subsequently proceed to the peer review process, which is a decision to be made at the sole discretion of the journal editor.

If you are asked to revise your manuscript during the review stage please submit a list of changes or a rebuttal against each point which is being raised when you submit the revised manuscript. The standard deadline for authors to submit the revision is 5 weeks. If you require a time extension to return the revision you should state the reasons for this extension and advise on a more feasible date for returning it.

Submission Address

New submissions for regular issues should be sent to

Please note that new submissions sent via EVISE will be returned to you with a request to submit via EES at

EVISE is only to be used for submissions of revised manuscripts and for submissions for the Special Issue: Randall R. Sakai, and the Special Issue: SSIB 2016.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATI ON

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- *Title.* Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names and affiliations.* Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- *Corresponding author.* Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- *Present/ permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Drugs

Proprietary (trademarked) names should be capitalized. The chemical name should precede the trade, popular name, or abbreviation of a drug the first time it occurs.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.). Please seek permission from individuals before acknowledging them in your article.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Anesthesia

In describing surgical procedures on animals, the type and dosage of the anesthetic agent should be specified. Curarizing agents are not anesthetics; if these were used, evidence must be provided that anesthesia of suitable grade and duration was employed.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.

- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
 - Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.
- You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork](#).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/physiology-and-behavior>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>