

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO EM UM MODELO DE
DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO PELO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE (1-40)
EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Leandro Cattelan Souza

Itaqui, RS, Brasil.

2012

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO EM UM MODELO DE
DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO PELO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE (1-40)
EM CAMUNDONGOS**

por

Leandro Cattelan Souza

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Bioquímica, pelo programa de
pós-graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Itaqui, RS, Brasil.

2012

Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO EM UM MODELO DE
DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO PELO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE₁₋₄₀ EM
CAMUNDONGOS**

elaborada por
Leandro Cattelan Souza

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse
(presidente, orientador)

Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm
(UFSM)

Prof^a. Dr^a. Ana Flávia Furian
(UFSM)

Itaqui, RS, Brasil.

2012

DEDICO

**Aos meus pais, Luis Carlos e Edna,
pelo amor e apoio incondicionais
que sempre me deram, e pela vida digna
que me propiciaram para que eu pudesse
crescer com honestidade,
perseverança e tranquilidade.**

**À minha namorada, Analuisa,
por todo seu apoio,
compreensão, carinho e amizade,
estando sempre ao meu lado,
mesmo nos momentos mais difíceis.**

**Ao meu orientador,
Prof. Dr. Cristiano Jesse,
por confiar no meu trabalho
e por todo o incentivo
para a realização deste mestrado;
pelos seus ensinamentos transmitidos,
além da amizade formada.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Dr. Cristiano Jesse, por oportunizar-me a retomada do meu desenvolvimento acadêmico, sempre acreditando no meu trabalho e transmitindo seus conhecimentos com muita competência e tranquilidade.

Ao prof. Dr. Mauro oliveira pelo suporte científico para a realização deste trabalho, sempre de forma solícita e amigável.

Ao colegas de laboratório Marcelo Gomes de Gomes, Carlos Borges Filho, Lucian del Fabbro, Stífani Araújo e Micheli Zarzecki por todo o auxílio procedimental deste trabalho. Em especial, ao Marcelo, Carlos e Lucian pelo incansável auxílio, empenho e dedicação em todos os experimentos, tornando a realização deste trabalho alegre e efetiva.

À minha família, especialmente meus pais Luis Carlos e Edna, que me deram todo o suporte necessário para o meu desenvolvimento pessoal, com muito carinho, amor e devoção.

À minha namorada Analuisa, por todo o apoio durante o transcorrer deste mestrado, celebrando as conquistas e me apoiando nos momentos de dificuldade.

Aos meus colegas da pós-graduação, André Rossito Goes, Silvana Peterini Boeira e Franciele Donato, por todo o auxílio para a execução deste trabalho e, sobretudo, pelo companheirismo durante as aulas e viagens. Especialmente ao André, por toda a ajuda na execução dos experimentos e pela companhia em viagens de estudo e congressos, além da amizade formada.

À prof^a. Dr^a. Daiana Silva de Ávila e prof^a. Dr^a. Francielli Weber dos Santos Cibin, pelo auxílio na qualificação científica deste trabalho.

Às professoras Carla Sehn e Marina Prigol, companheiras de sala e laboratório, pela convivência amigável e compreensiva durante o transcorrer deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, representado pelos professores Vanderlei Folmer e Robson Puntel,

pela oportunidade de cursar este mestrado, propiciando um crescimento acadêmico e pessoal de alto nível. A todos os professores e funcionários que fizeram parte deste caminhar.

À Universidade Federal do Pampa, por toda a oportunidade concedida, em especial aos funcionários do campus Itaqui, pela compreensão e presteza.

Ao programa de bolsas de desenvolvimento acadêmico, PBDA, pela concessão da bolsa de estudos.

A CAPES e a FAPERGS, que garantiram o sustento financeiro necessário à realização deste projeto de mestrado.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que este percurso pudesse ser concluído.

SUMÁRIO

PARTE I

Resumo	11
Abstract	12
Lista de Figuras	13
Lista de Tabelas	15
Lista de Abreviaturas	16
Introdução	20
Doença de Alzheimer	20
Exercício físico e doença de Alzheimer	26
Exercício físico e estresse oxidativo	30
Exercício físico e neuroinflamação	36
Objetivos	41

PARTE II

MANUSCRITO

Neuroprotective effect of physical exercise in a mouse model of Alzheimer's disease induced by β-amyloid₁₋₄₀ peptide	42
1. Introduction	46
2. Materials and Methods	48
2.1 Animals	48
2.2 Experimental design	48
2.3 Swimming (ST) training protocol	48
2.4 I.c.v. injection of A β ₁₋₄₀	49
2.5 Behavioral assessment	50
2.5.1 Open-field test (OFT)	50
2.5.2 Object recognition test (ORT)	50
2.6 Tissue preparation	51
2.7 Biochemical determinations	51

2.7.1 Reactive species (RS) levels	51
2.7.2 Non-protein thiols (NPSH) levels	51
2.7.3 Superoxide dismutase (SOD) activity	52
2.7.4 Catalase (CAT) activity	52
2.7.5 Glutathione peroxidase (GPx) activity	52
2.7.6 Glutathione reductase (GR) activity	53
2.7.7 Glutathione s-transferase (GST) activity	53
2.7.8 Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) levels	53
2.8 Aerobic metabolism assay	53
2.8.1 Citrate Synthase (CS) activity	53
2.8.2 Mitochondrial respiratory complex activities	54
2.9 Protein determination	54
2.10 Statistical analysis	54
3. Results	55
3.1 Assessment of muscle oxidative metabolism	55
3.2 Behavioral assessment	55
3.2.1 Locomotor activity in ORT and OFT	55
3.2.2 Short-term memory (STM) in ORT	55
3.2.3 Long-term memory (LTM) in ORT	56
3.3 Biomarkers of oxidative stress.....	56
3.3.1 NPSH and RS levels	56
3.3.2 SOD and CAT activities	57
3.3.3 GR activity	57
3.3.4 GPx activity	58
3.3.5 GST activity	58
3.4 Biomarkers of neuroinflammation.....	58
3.4.1 TNF- α and IL-1 β (proinflammatory cytokines) levels	58
3.4.2 IL-10 (anti-inflammatory cytokine) levels	59
4. Discussion	60
4.1 Swimming training protected against cognitive impairment elicited by A β ₁₋₄₀ ..	60
4.2 Swimming training alleviated oxidative stress in the hippocampus and prefrontal cortex	62

4.3 Swimming training attenuated neuroinflammation in the hippocampus and prefrontal cortex	64
5 Conclusions	66

PARTE III

Discussão	88
Conclusão	99
Referências	100
Perspectivas	119
Anexo I	120

PARTE I

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa

EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO FÍSICO EM UM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO PELO PEPTÍDEO β -AMILÓIDE₁₋₄₀ EM CAMUNDONGOS

Autor: Leandro Cattelan Souza

Orientador: Cristiano Ricardo Jesse

Local e data da defesa: Uruguaiana-Rs, 17 de janeiro de 2013.

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem crônico-degenerativa, caracterizada clinicamente por uma perda gradual e progressiva da memória. Há um substancial corpo de evidências demonstrando o papel central do peptídeo beta-amilóide ($A\beta$) na fisiopatologia da DA. A administração intracerebral desde peptídeo em roedores tem mostrado ser um modelo bastante útil para o estudo desta doença e intervenções neuroprotetoras. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito de um treinamento de natação (ST) sobre o comportamento cognitivo e marcadores de estresse oxidativo e neuroinflamação em um modelo de doença de Alzheimer induzido pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos Swiss Albinos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: (1) sedentário/veículo; (2) sedentário/ $A\beta_{1-40}$; (3) exercício/veículo; (4) exercício/ $A\beta_{1-40}$. Os grupos $A\beta$ receberam infusão intracerebroventricular (i.c.v.) do peptídeo $A\beta_{1-40}$ ($3\mu\text{l/sítio}$; 400pmol/animal) e os grupos veículo infusão i.c.v. de veículo PBS (*phosphate-buffered-saline*; $3\mu\text{l/sítio}$). Os grupos exercício foram submetidos a um ST com aumento progressivo de intensidade e duração por 8 semanas (5x/semana), e os grupos sedentários mantidos em inatividade física. Após 24 horas da última sessão de exercício, os camundongos receberam $A\beta_{1-40}$ ou PBS (rota i.c.v.). Sete dias após as infusões i.c.v., os camundongos foram submetidos a testes comportamentais e, finalmente, à eutanásia. O hipocampo (HC) e o córtex pré-frontal (PFC) foram removidos para os ensaios bioquímicos. Nossos resultados demonstraram que o ST foi efetivo em atenuar as seguintes alterações causadas pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$: (1) prejuízos nas memórias de curto e longo prazo no teste de reconhecimento de objetos, sem alterar a atividade locomotora; (2) aumento dos níveis de espécies reativas (RS) e diminuição dos níveis de tióis não-protéicos (NPSH) no HC e PFC; (3) inibição da atividade da superóxido dismutase (SOD) e aumento da atividade da glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione-S-transferase (GST) no HC e PFC; (4) Aumento dos níveis de interleucina-1 beta ($IL-1\beta$) e fator de necrose tumor-alfa ($TNF-\alpha$) e diminuição dos níveis de interleucina-10 ($IL-10$) no HC e PFC. Em conclusão, nós sugerimos que o exercício regular pode prevenir o declínio cognitivo, o estresse oxidativo e a neuroinflamação induzida pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos, suportando a hipótese de que o exercício pode ser utilizado como uma medida não-farmacológica para reduzir os sintomas da DA.

Palavras-chave: doença de Alzheimer, exercício, peptídeo $A\beta_{1-40}$, estresse oxidativo, neuroinflamação.

ABSTRACT

Dissertation of Master
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF PHYSICAL EXERCISE IN A MOUSE MODEL OF ALZHEIMER DISEASE INDUCED BY B-AMYLOID (1-40) PEPTIDE

Author: Leandro Cattelan Souza

Advisor: Cristiano Ricardo Jesse

Site and Date of defence: Uruguaiana-Rs, January 17, 2013.

Alzheimer's disease (AD) is a chronic degenerative disorder, clinically characterized by gradual and progressive decline in memory. There is a substantial body of evidence demonstrating the central role of beta-amyloid (A β) peptide in the pathophysiology of AD. The administration of this peptide into the brain of rodents has been shown to be a useful model for the study of this disease and neuroprotective interventions. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of swimming training (ST) on cognitive behavioral and markers of oxidative stress and neuroinflammation in a mouse model of DA induced by A β ₁₋₄₀ peptide. The animals were randomly assigned into four groups: (1) sedentary/vehicle; (2) sedentary/A β ₁₋₄₀; (3) exercise/vehicle; and (4) exercise/A β ₁₋₄₀. A β ₁₋₄₀ groups received intracerebroventricular (i.c.v.) injection of A β ₁₋₄₀ (3 μ l/site; 400pmol/mouse) and vehicle groups received i.c.v. injection of PBS (phosphate-buffered-saline; 3 μ l/site). Exercise groups were submitted to swimming training (ST) with progressive increase in time and duration for 8 weeks (5x/week), and sedentary groups were kept in physical inactivity. After 24h of last bout of ST, mice received A β ₁₋₄₀ or vehicle (by i.c.v. route). Seven days after i.c.v. injections, mice were submitted to cognitive behavioural tests and, finally, submitted to euthanasia. The hippocampus (HC) and prefrontal cortex (PFC) were removed for biochemical assays. Our results demonstrated that ST was effective in attenuating the following impairments caused by A β ₁₋₄₀ peptide: (1) impairment on short-term and long-term memories in object recognition test, without altering the locomotor activity; (2) increased reactive species (RS) levels and decreased non-protein thiols (NPSH) levels in HC and PFC; (3) inhibition of the superoxide dismutase (SOD) activity and increase in glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) activities in HC and PFC; and (4) increased tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-1 beta (IL-1 β) levels and reduced and interleukin-10 (IL-10) levels in HC and PFC. In conclusion, we suggest that regular exercise may prevent cognitive decline, oxidative stress and neuroinflammation induced by A β ₁₋₄₀ peptide in mice, supporting the hypothesis that exercise can be used as a non-pharmacological tool to reduce the symptoms of DA.

Keywords: Alzheimer's disease, A β ₁₋₄₀ peptide, oxidative stress, neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1 - Ilustração das rotas não-amiloidogênica e amiloidogênica da proteólise da molécula APP	21
Figura 2 - Hipótese da cascata amilóide	23
Figura 3 - Neurotoxicidade dos oligômeros A β	24
Figura 4 - Curva hipotética da cinética de morte neuronal. Mostrando uma queda exponencial nos primeiros anos, onde intervenções protetoras como o exercício poderiam ser mais efetivas	27
Figura 5 - Mecanismos da produção de RS induzida pelo exercício	33
Figura 6 - Cascata de citocinas induzida pelo exercício, com o surgimento de moduladores anti-inflamatórios no plasma	38
Figura 7 - Potenciais mecanismos anti-inflamatórios do exercício	39

PARTE II

Figura 1 - Visão geral do protocolo de procedimentos experimentais	79
Figura 2 - Efeito do treinamento de natação sobre a atividade da CS e sobre a atividade das enzimas dos complexos mitocondriais I, II e IV no músculo quadríceps femoral	80
Figura 3 - Efeito do treinamento de natação e da infusão i.c.v. do peptídeo A β (1-40) sobre o tempo de exploração total no ORT (A) e sobre os números de cruzamentos no OFT (B)	81
Figura 4 - Efeito do treinamento de natação e da infusão i.c.v. do peptídeo A β (1-40) sobre a STM e a LTM	82
Figura 5 - Efeito do treinamento de natação e da infusão i.c.v. do peptídeo A β (1-40) sobre os níveis de NPSH (A: hipocampo; B: córtex pré-frontal) e sobre os níveis de RS (C: hipocampo; D: córtex pré-frontal)	83
Figura 6 - Efeito do treinamento de natação e da infusão i.c.v. do peptídeo A β (1-40) sobre as atividades da SOD (A: hipocampo; B: córtex pré-frontal) e CAT (C: hipocampo; D: córtex pré-frontal)	84
Figura 7 - Efeito do treinamento de natação e da infusão i.c.v. do peptídeo A β (1-40) sobre as atividades da GR (A: hipocampo; B: córtex pré-frontal), GPx (C: hipocampo; D: córtex pré-frontal) e GST (E: hipocampo; F: córtex pré-frontal) ..	85
Figura 8 - Efeito do treinamento de natação e da infusão i.c.v. do peptídeo A β (1-40) sobre os níveis de TNF- α (A: hipocampo; B: córtex pré-frontal), IL-1 β (C: hipocampo; D: córtex pré-frontal) e IL-10 (E: hipocampo; F: córtex pré-frontal) ..	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de treinamento de natação de 8 semanas	87
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

DA = Doença de Alzheimer

APP = *Amyloid precursor protein* = Proteína precursora de amilóide

PS1 = Presenilina 1

PS2 = Presenilina 2

SORL = *Sortilin-related receptor* = gene relacionado ao receptor da sortilina

A β = *Amyloid-beta* = Beta-amilóide

NFT = *Neurofibrillary tangles* = Emaranhados neurofibrilares

ADAM = *A disintegrin and metalloproteinase* = proteína que apresenta os domínios metalopeptidase e tipo-desintegrina

sAPP α = Fragmento solúvel da proteína precursora amilóide gerado por ação de α -secretase

sAPP β = Fragmento solúvel da proteína precursora amilóide gerado por ação de β -secretase

C83 = produto proteolítico da clivagem da APP pela α -secretase contendo 83 resíduos C-terminal

C99 = produto proteolítico da clivagem da APP pela β -secretase contendo 99 resíduos C-terminal

BACE 1 = *β -site APP cleaving enzyme* = enzima β -secretase

A β ₁₋₄₀ = isoforma do peptídeo beta-amilóide com 40 aminoácidos

A β ₁₋₄₂ = isoforma do peptídeo beta-amilóide com 42 aminoácidos

SUP = sistema ubiquitina-proteossoma

GSK3 β = *Glycogen synthase kinase 3-beta* = glicogênio sintase quinase 3-beta

CDK5 = *Cyclin-dependente kinase-5* = quinase dependente de ciclina-5

ERK1 = *Extracellular signal regulated kinase-1* = quinase regulada por sinal extracelular tipo 1

ERK2 = *Extracellular signal regulated kinase-2* = quinase regulada por sinal extracelular tipo 2

p-ERK = forma fosforilada da proteína quinase regulada por sinal extracelular

p-p38 = forma fosforilada da proteína p-38 pertencente à classe das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK)

I.c.v. = intracerebroventricular

STZ = streptozotocina

COX-2 = ciclooxigenase-2

RL = radicais livres

TNF- α = *tumor necrosis factor-alpha* = fator de necrose tumoral-alfa

IL-1 β = interleucina 1-beta

IL-1 = interleucina 1

IL-6 = interleucina 6

IL-8 = interleucina 8

IL-10 = interleucina 10

IL-15 = interleucina 15

IL-1ra = *IL-1 receptor antagonist* = antagonista do receptor de interleucina-1

sTNF- α = *soluble tumor necrosis factor- α receptor* = receptor solúvel do fator de necrose tumoral-alfa

SNC = Sistema nervoso central

TLR = *toll-like receptor* = receptores tipo-toll

APOE = apolipoproteína E

PIB = *Pittsburgh compound B* = composto B de Pittsburg

PET = *Positron emission tomography* = tomografia por emissão de pósitrons

NT3 = neurotrofina 3

NT4 = neurotrofina 4

NT5 = neurotrofina 5

NT6 = neurotrofina 6

NGF = *Nerve growth factor* = fator de crescimento neural

BDNF = *Brain-derived neurotrophic factor* = fator neurotrófico derivado do cérebro

CAMPK II = *calcium/calmodulin-stimulated protein kinase II* = proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina

MAPK = *Mitogen-activated protein kinases* = proteínas quinases ativadas por mitógenos

CREB = *cAMP response element-binding protein* = proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc

NF κ B = *Nuclear factor-kappaB* = fator nuclear kappa-B

LTP = long-term potentiation = potenciação de longo-prazo

VEGF = *Vascular endothelial growth factor* = fator de crescimento endotelial vascular

EO = estresse oxidativo

RS = *reactive species* = espécies reativas

HNE = 4-Hydroxinonenal

NPSH = *non-protein thiols* (tióis não-protéicos)

CAT = catalase

SOD = superóxido dismutase

GPx = glutationa peroxidase

GSSG = glutationa oxidada

GSH = glutationa reduzida

GR = glutationa redutase

GST = glutationa s-transferase

TRAP = *total reactive antioxidant potential* = capacidade antioxidante total

CS = citrato sintase

HC = hipocampo

PFC = *prefrontal cortex* = córtex pré-frontal

ST = *swimming training* = treinamento de natação

ORT = *object recognition test* = teste de reconhecimento de objetos

OFT = *open-field test* = teste de campo aberto

LTM = *long-term memory* = memória de longo prazo

STM = *short-term memory* = memória de curto prazo

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO** e **OBJETIVOS**. Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra no item **MANUSCRITO, parte II** deste trabalho. As seções materiais e métodos, resultados, discussão dos resultados e referências bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÃO**, encontrados na **parte III** desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados apresentados no manuscrito neste trabalho. O item **REFERÊNCIAS** refere-se somente às citações que aparecem nos itens introdução, discussão e conclusão desta dissertação. No ítem **PERSPECTIVAS**, estão expostos os possíveis estudos para dar continuidade a este trabalho.

INTRODUÇÃO

1. Doença de Alzheimer

Dados recentes mostraram que a prevalência global da doença de Alzheimer (DA) era de 26.6 milhões de pessoas em 2006, com uma expectativa de aumento para 106.8 milhões de pessoas em 2050 (Lautenschlager et al., 2012). A DA é a causa mais comum de demência, cuja apresentação clínica típica é a perda progressiva da memória e das funções cognitivas (Bateman et al., 2012). Com diminuição considerável da independência funcional e causando sofrimento ao paciente, familiares e cuidadores, a DA pode levar à morte dentro de 3 a 9 anos após o seu diagnóstico (Bateman et al., 2012; Querfurth e Laferla, 2012). O principal fator de risco para a DA é a idade, com sua incidência dobrando a cada 5 anos após os 65 anos de idade (Querfurth e Laferla, 2012). Outros fatores de risco incluem os genéticos, doenças cardiometabólicas, traumatismo cerebral e fatores ambientais como o consumo de cigarro e exposição ao alumínio (Ballard et al., 2011; Nunomura et al., 2006). Do ponto de vista genético, mutações nos genes da proteína precursora de amilóide (APP) e das presenilinas 1 (PS1) e 2 (PS2) são responsáveis pelo desenvolvimento precoce da doença, ao passo que mutações no gene relacionado ao receptor da sortilina (SORL) estão implicadas com o desenvolvimento tardio da doença (Ballard et al., 2011).

A despeito da etiologia da DA ser inconclusiva, há um substancial corpo de evidências demonstrando o papel de “pivô central” do peptídeo beta-amilóide (A β) na fisiopatologia da doença (Laferla et al., 2007; Prediger et al., 2007; Tarawneh e Holtzman, 2010; Bateman et al., 2012; Zhao et al., 2012). Neste sentido, o acúmulo intra e extracelular do peptídeo A β no cérebro é responsável pela formação de placas amilóides extracelulares e emaranhados neurofibrilares (NFT) intracelulares, dois marcadores neuropatológicos patognomônicos da doença (Ballard et al., 2011). Laferla (2008) sustenta que o acúmulo do peptídeo A β ocorre devido a falhas nos mecanismos de produção

(hiperprodução) e degradação (redução do *clearance* amilóide). O peptídeo A β (38-43 aminoácidos) é derivado de uma molécula precursora denominada proteína precursora amilóide (APP), a qual é uma proteína transmembrana consistindo de 695-770 aminoácidos. A molécula APP pode sofrer proteólise por 2 rotas, uma não-amiloidogênica e outra amiloidogênica, como mostra a figura 1.

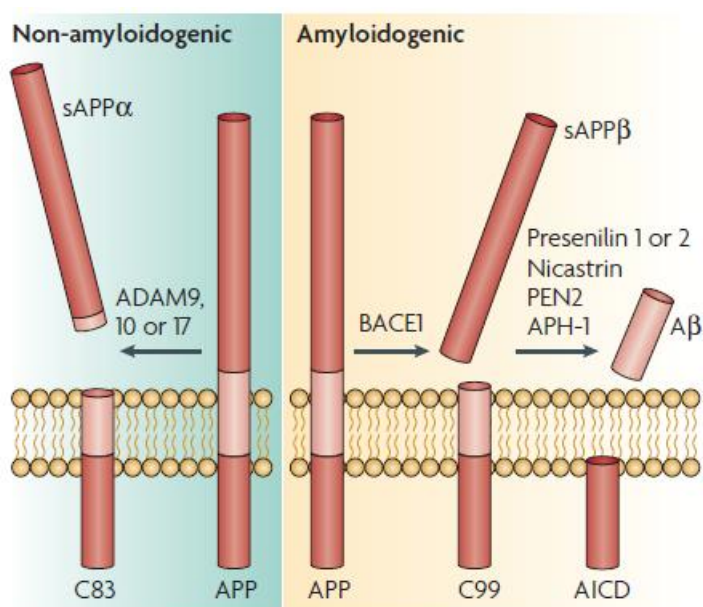


Figura 1: Ilustração das rotas não-amiloidogênica e amiloidogênica da proteólise da molécula APP.

sAPP α : fragmento solúvel da proteína precursora amilóide gerado por ação de α - secretase; ADAM 9/10 ou 17: = proteína que apresenta os domínios metalopeptidase e tipo-desintegrina tipos 9/10 ou 17; C83: produto proteolítico da clivagem da APP pela α -secretase contendo 83 resíduos C-terminal; APP: proteína precursora de amilóide; BACE1: enzima beta-secretase; C99: produto proteolítico da clivagem da APP pela β -secretase contendo 99 resíduos C-terminal; sAPP β : fragmento solúvel da proteína precursora amilóide gerado por ação de β - secretase; PEN2: estimulador da presenilina-2; APH-1: *anterior pharynx-defective 1*; A β : peptídeo β -amilóide; AICD: domínio intracelular da APP.

Fonte: Laferla et al., 2007

Resumidamente, em neurônios funcionais, a rota não-amiloidogênica é a predominante. Nesta rota, a clivagem enzimática da APP é mediada pela

enzima α -secretase (pertencente à família das desintegrinas e metaloproteases – ADAM) que atua ao nível de bicamada lipídica. A clivagem realizada pela α -secretase ocorre dentro do domínio A β , prevenindo a formação e liberação do peptídeo A β (Laferla et al., 2007). Além disso, a clivagem da α -secretase libera dois fragmentos, o C83 (que não pode ser convertido em peptídeo amilóide) e o ectodomínio s APP α , o qual é reportado ter função neuroprotetora, podendo atuar como um fator de crescimento (Zhang et al., 2012a). Por outro lado, em neurônios disfuncionais predomina a rota amiloidogênica, onde a molécula APP é clivada pela enzima β -secretase (*β -site APP cleaving enzyme*: BACE 1) no “raft lipídico” da membrana plasmática, liberando o ectodomínio s APP β e restando ao nível de membrana os últimos 99 aminoácidos da molécula APP (C99) (Laferla et al., 2007). Foi sugerido atualmente que o ectodomínio s APP β pode ser clivado e gerar um N-terminal que ativa a sinalização apoptótica da caspase-6 (Zhang et al., 2012a). O fragmento C99, por sua vez, é subsequente clivado a 38-43 aminoácidos pelo complexo γ -secretase (que inclui as presenilinas 1 e 2 – PS1, PS2). Esta clivagem produz predominantemente os peptídeos A β_{1-40} e A β_{1-42} , em uma razão de 10:1, respectivamente (Laferla et al., 2007). Apesar de mais abundante, a isoforma A β_{1-40} é mais solúvel e menos propensa a formar placas amilóides (Ballard et al., 2011). A isoforma A β_{1-42} é insolúvel e forma placas facilmente (Ballard et al., 2011) tendo também mais afinidade por metais de transição redox ativos, e.g. Cu⁺ e Fe⁺², produzindo mais radicais hidroxil através das reações de Fenton (Jomova et al., 2010; Jomova e Valko, 2011). O acúmulo de isoformas do peptídeo A β em regiões corticais é o pilar da hipótese da cascata amilóide (Ballard et al., 2011; Bateman et al., 2012). Segundo esta hipótese, os peptídeos A β em sua forma monomérica sofrem processo de oligomerização, formando oligômeros (2 a 12 peptídeos) que são as formas mais neurotóxicas e responsáveis por originar as placas amilóides (agregados de fibrilas amilóides). Acumulados no meio intra e extraneuronal, estes oligômeros induzem eventos tóxicos, causando disfunção sináptica e morte de neurônios (Ballard et al., 2011), como ilustrado pela figura 2.

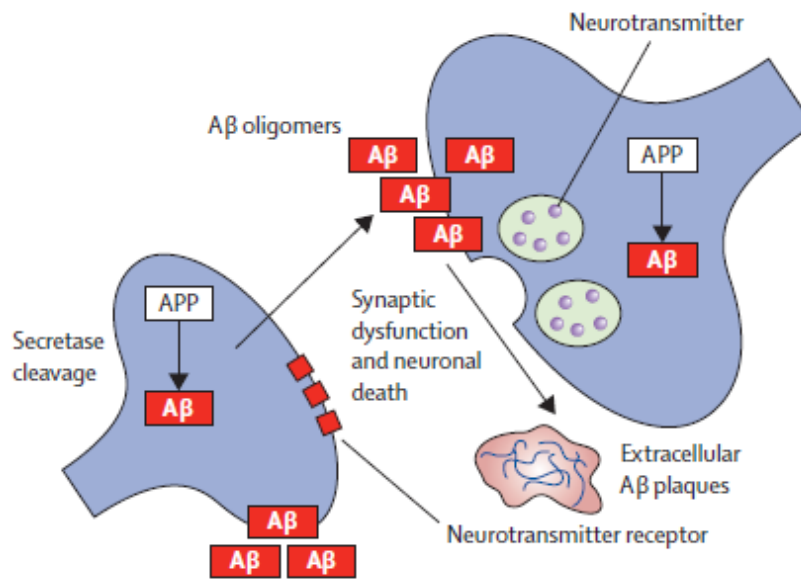


Figura 2: Hipótese da cascata amilóide.

Aβ = peptídeo beta-amilóide; APP = proteína precursora de amilóide.

Fonte: Ballard et al., 2011.

Neste contexto, a neurotoxicidade induzida pelos agregados Aβ gera uma cascata de insultos celulares, causando lesões mitocondriais, distúrbio do metabolismo do cálcio, lesão de retículo endoplasmático, internalização de receptores de neurotransmissores e inibição do sistema ubiquitina-proteossoma (SUP) (Laferla, 2008). O SUP é um complexo citosólico que degrada proteínas danificadas e excedentes, o qual é responsável por um dos mecanismos de degradação amilóide e, deste modo, é um sistema chave na fisiopatologia da DA (Laferla et al., 2007). Outro fenômeno importante a ressaltar, é a relação entre o peptídeo Aβ e a proteína tau, uma proteína responsável pela estabilização dos microtúbulos do citoesqueleto neuronal (Tarawneh e Holtzman, 2010). Em condições normais, as formas fosforilada e desfosforilada da proteína tau estão em equilíbrio. Entretanto, o aumento dos níveis de peptídeos Aβ pode induzir a hiperfosforilação desta proteína através da ativação de fosfoquinases específicas, nomeadamente glicogênio sintase quinase 3β (GSK3β), quinase dependente de ciclina (CDK5) e quinase dependente de sinal extracelular (ERK2) (Ballard et al., 2011; Laferla, 2008). Uma vez fosforiladas, as proteínas tau perdem sua afinidade pelos microtúbulos, agregando-se no corpo dos neurônios na forma de pares de

filamentos helicoidais, que são os NFT. Uma vez desestruturado o citoesqueleto neural e em razão da toxicidade direta dos NFT, a transmissão neural é prejudicada (Huang e Jian, 2009). Um resumo dos eventos tóxicos dos oligômeros A β é representado pela figura 3.

O resultado da neurotoxicidade A β -induzida a nível anatômico é a atrofia de regiões corticais onde ocorrem os depósitos amilóides e que estão relacionadas à memória, aprendizado e à emoção, como o córtex entorrinal, hipocampo, prosencéfalo basal e amígdala (Mattson, 2004).

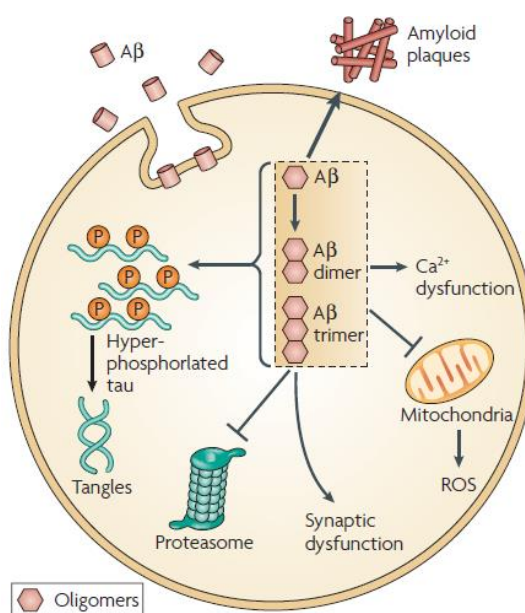


Figura 3: Neurotoxicidade dos oligômeros A β .

Fonte: Laferla et al. 2007

Além das placas amilóides e dos NFT, muitos estudos reportam que o estresse oxidativo e a neuroinflamação são importantes marcadores neurobiológicos da DA, sendo considerados dois mecanismos da neurotoxicidade induzida pelo peptídeo A β (Squier et al., 2001; Nunomura et al., 2006; Jomova et al., 2010; Zhao et al., 2012). Nunomura et al. (2006) sustentam que lesões radiculares precedem a deposição amilóide no cérebro, indicando que o estresse oxidativo pode ser o gatilho para a amiloidogênese, já estando presente na fase prodrômica da doença. Recentemente, foi demonstrado que a infusão intracerebroventricular (i.c.v.) de peptídeo A β ₁₋₄₀

pode mimetizar alguns sinais da DA em roedores, induzindo estresse oxidativo, neuroinflamação e prejuízos cognitivos (Prediger et al., 2007; Passos et al., 2010; Piermartini et al., 2010; Gao et al., 2012; Santos et al., 2012). Prediger et al. (2007) verificaram níveis diminuídos de glutathiona (GSH) no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos Swiss albinos após 7 dias da administração i.c.v. de A β ₁₋₄₀. Similarmente, Piermatini et al. (2011) demonstraram que a infusão i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ induziu peroxidação lipídica, morte celular e aumento dos níveis da ciclooxigenase-2 (COX-2) no hipocampo de camundongos Swiss albinos. Aumentando os níveis de radicais livres (RL) o peptídeo A β pode induzir disfunção sináptica, cascatas de apoptose, hiperfosforilação da proteína tau e, conseqüentemente, redução da capacidade cognitiva (Mattson, 2004).

Além do estresse oxidativo, há um considerável corpo de evidências demonstrando que uma resposta inflamatória patológica está presente em doenças neurodegenerativas, como na doença de Parkinson e DA (Tupo e Arias, 2005; Gleesom et al., 2011; Leem et al., 2011; Pervaiz e Hoffman-Goetz, 2011; Woods et al. 2012). De fato, citocinas pró-inflamatórias clássicas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina 1-beta (IL-1 β) estão implicadas com o declínio cognitivo e a demência (Foster et al., 2011). Por exemplo, níveis de TNF- α no córtex frontal, temporal e parietal e níveis de IL-1 β encontram-se elevados em pacientes com DA, assim como os níveis de TNF- α e IL-1 estão aumentados no hipocampo de camundongos transgênicos para DA (Pervaiz e Hoffman-Goetz, 2011). Insultos celulares como infecções e o estresse oxidativo ativam células gliais, e.g. micróglia astrócitos, que liberam citocinas inflamatórias – que em níveis elevados podem ativar rotas de apoptose, como a rota da caspase-3 – acelerando os processos neurodegenerativos (Dickson, 2004). Medeiros et al. (2010) indicam que o TNF- α é um importante mediador da neurotoxicidade A β ₁₋₄₀-induzida, estando relacionado com o declínio da memória em camundongos. Nesse sentido, o peptídeo A β , *per se*, pode atuar como um agente pró-inflamatório causando a ativação de muitos componentes inflamatórios, como os astrócitos, as micróglia e o sistema do complemento (Tupo e Arias, 2005). Além disso, as micróglia são ativadas pelas placas amilóides, uma vez que estas células possuem papel central na resposta a lesões patológicas no SNC, devido às

suas funções fagocíticas (Tupo e Arias, 2005). Em verdade, há uma importante relação entre estresse oxidativo e neuroinflamação. Os RL podem ativar receptores tipo-toll (TLR) de células imunes que desempenham importante papel em rotas de sinalização para inflamação (Woods et al., 2012), assim como as micróglias ativadas podem produzir RL (Tupo e Arias, 2005).

A relação causa x efeito entre o peptídeo A β e os eventos de estresse oxidativo e neuroinflamação é inconclusiva. Há estudos que apontam que o estresse oxidativo decorrente do envelhecimento ou da disfunção mitocondrial (Verri et al., 2012), ou ainda a neuroinflamação seriam o gatilho inicializador da amiloidogênese e toda sua cascata neurodegenerativa (Frank-Cannon et al., 2009). No entanto, o que se percebe com clareza é que respostas oxidativas e inflamatórias estão presentes tanto em estágios iniciais quanto finais da doença (antes e depois do acúmulo amilóide) e, portanto, são importantes alvos terapêuticos da DA.

2. Exercício físico e DA

O exercício físico é considerado um dos mais importantes fatores de proteção para a DA, junto com os fatores nutricionais e atividades ocupacionais e educacionais (Ballard et al. 2011). Vários estudos indicam que o exercício físico pode melhorar a função cognitiva e prevenir a demência em idosos (Kramer et al., 2006; Lista e Sorrentino, 2010; Radak et al., 2010; Lautenschlager et al., 2012; Stranaham e Mattson, 2012). De fato, resultados de estudos transversais e epidemiológicos prospectivos e retrospectivos das últimas duas décadas têm demonstrado uma correlação positiva entre o exercício físico e a cognição em idosos (Lista e Sorrentino, 2010). A prevenção do declínio cognitivo induzida pelo exercício é também verificada em portadores de DA de ordem genética, como portadores de polimorfismos da apolipoproteína E (APOE) com a presença do alelo ϵ -4, que aumenta o risco de desenvolver a doença em até 7x. Esta lipoproteína está envolvida no controle da carga amilóide (Foster et al., 2011). Além disso, é observada uma considerável relação entre a aptidão física e o desempenho cognitivo (Soumare et al., 2009) e progressão à demência em idosos com DA (Vidoni et al., 2011). Foster et al. (2011) reportaram efeitos positivos do exercício físico sobre

biomarcadores da DA em humanos. Segundo estes autores, é observado uma redução da captação do composto de imageamento de Pittsburgh (PIB) no exame de tomografia por emissão de pósitrons (PET) em indivíduos fisicamente ativos. O PIB é uma molécula rastreadora radioativa capaz de se ligar às placas amilóides, e permite o diagnóstico precoce da doença. Ademais, estes autores explanam que são encontrados níveis aumentados de $A\beta_{1-42}$ no líquido cerebrospinal de pacientes de DA sedentários, e que isto pode ser revertido pelo exercício físico.

Especula-se que o exercício tenha um efeito positivo sobre a cinética de degeneração neural, bloqueando o *continuum* da demência. Neste sentido, o processo neurodegenerativo exhibe uma rápida perda neuronal na fase inicial, sendo um momento propício para intervenções protetoras. É nesta fase que o exercício pode ser mais efetivo, agindo profilaticamente (Foster et al., 2011), como demonstrado na figura 4.

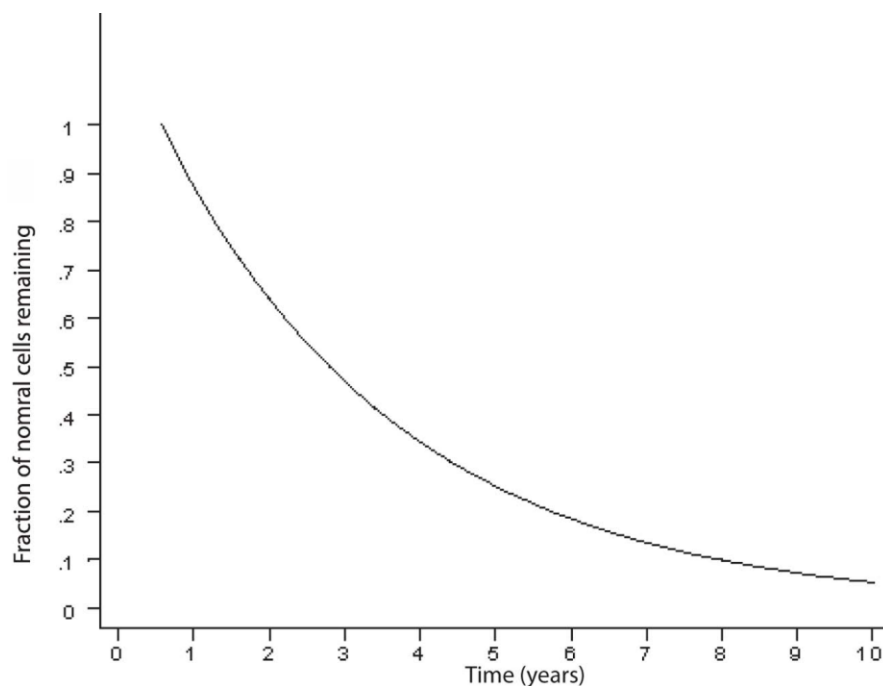


Figura 4: Curva hipotética da cinética de morte neuronal. Mostrando uma queda exponencial nos primeiros anos, onde intervenções protetoras como o exercício poderiam ser mais efetivas.

Fonte: Foster et al., 2011.

Decerto, estudos utilizando modelos animais demonstraram que o exercício regular é capaz de alterar diversas características fenotípicas da DA, como redução do acúmulo amilóide (Adlard et al., 2005; Nichol et al., 2008; Yuede et al., 2009), aumento da degradação amilóide (Radák et al., 2001; Ogonovszky et al., 2005), redução do acúmulo da forma hiperfosforilada da proteína tau (Leem et al., 2009; Belarbi et al., 2011) e redução da morte neuronal (Um et al., 2011), assim como melhoria da memória, em diferentes modelos de camundongos transgênicos para DA (Nichol et al., 2008; Parachikova et al., 2008; García-Meza et al., 2011; Liu et al., 2011).

Apesar de haver um grande corpo de evidências suportando o efeito protetor do exercício sobre a cognição e o risco de desenvolver doenças neurodegenerativas como a DA, os mecanismos biológicos e moleculares subjacentes a este efeito permanecem não totalmente elucidados. Tem sido demonstrado que o cérebro é responsivo ao exercício. Dois dos principais mecanismos exercício-induzidos são a neurogênese e a neuroplasticidade, mediados por famílias de moléculas neurotróficas, como as neurotrofinas (Vivar et al., 2012). Estas moléculas são sintetizadas e liberadas por neurônios assim como por tecidos inervados não-neuronais, e.g. músculo-esquelético (Lessmann e Brigadski, 2009). Elas atuam como fatores de crescimento, sendo essenciais para a diferenciação, crescimento e sobrevivência de neurônios, células gliais e formação de novas sinapses; algumas delas incluem os fatores neurotróficos 3, 4/5 e 6 (NT 3, NT 4/5 e NT/6), fator de crescimento neural (NGF) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Poo, 2001). O BDNF é considerado o modulador crítico da neuroplasticidade induzida pelo exercício (Cotman et al., 2007). Nesse sentido, foi demonstrado que o exercício pode aumentar a proliferação de células tronco neurais pluripotenciais e sua diferenciação em neurônios, o que pode ser responsável pelo aumento da memória e do aprendizado (Foster et al., 2011). De fato, tanto os níveis quanto a expressão de BDNF em diferentes regiões cerebrais sofrem aumento em resposta ao exercício, sobretudo no hipocampo (Neeper et al., 1995; Berchtold et al., 2005). O exercício, particularmente o aeróbio, é capaz de modular os níveis periféricos de BDNF em humanos, aumentando os níveis séricos desta neurotrofina. O BDNF pode atravessar a barreira hemato-encefálica nas duas direções e, em vista disso, seus níveis periféricos podem representar uma

importante reserva cerebral (Coelho et al., 2012). Em roedores, foi demonstrado que o aumento basal dos níveis de BDNF no hipocampo ocorre em poucos dias de exercício voluntário em rodas de correr (Johnson e Mitchell, 2003), com este efeito persistindo por até 2 semanas após sua interrupção (Bertchold et al., 2010). Estudos também demonstraram que o aumento dos níveis de BDNF no hipocampo eram positivamente correlacionados com a distância percorrida nas rodas de correr, o que sugere que o efeito do exercício pode ser volume-dependente (Johnson e Mitchell, 2003; Bertchold et al., 2005). Uma supra-regulação dos níveis de BDNF no hipocampo também foi demonstrada por estudos que utilizaram protocolo de corrida em esteira (Casillas et al., 2012) e natação (Ogonovszky et al., 2005). Interessantemente, Liu et al. (2011) mostraram que o treinamento em esteira com baixa intensidade e duração de até 30 minutos, aumentou a expressão hipocampal de BDNF, em conjunto com diminuição do declínio cognitivo e morte neuronal em camundongos transgênicos para DA (APP/PS1 – que super-expressam as proteínas APP e PS1). Este resultado reforça o envolvimento do BDNF como modulador da neuroproteção do exercício frente à DA. Além disso, foi demonstrado que o exercício pode amplificar a eficácia sináptica, na medida em que genes relacionados à função sináptica como a sinapsina I (envolvida na liberação de vesículas sinápticas) e a sinaptogamina (envolvida na formação de vesículas sinápticas) têm sua expressão aumentada em resposta ao exercício, com este efeito sendo mediado via BDNF (Molteni et al., 2002).

Com efeito, o exercício pode aumentar tanto o BDNF quanto os componentes de suas vias de sinalização para a neurogênese e sinaptogênese, e.g. ao ativar rotas de sinalização da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CAMPK II) e de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK). Estas sinalizações intracelulares estão implicadas com o aumento da produção de sinapsina I e pela ativação do fator de transcrição CREB (*cAMP response elemento binding protein*). O CREB é uma molécula chave para a potenciação de longo prazo (LTP) no hipocampo – um fenômeno importante na formação da memória de longo prazo (Molteni et al., 2002; Lista e Sorrentino, 2010). O BDNF pode inclusive, ativar direta ou indiretamente a neurogênese através do aumento dos níveis de neurotransmissores, como a acetilcolina (Lista e Sorrentino, 2010).

Em resumo, a modulação do BDNF é um dos mecanismos moleculares de neuroproteção e melhoria da função cognitiva induzidos pelo exercício, sendo encontrado em humanos e animais saudáveis e transgênicos para DA. Entretanto, estes mecanismos ainda necessitam serem mais bem compreendidos. Não menos importantes, foram evidenciados outros mecanismos protetivos do exercício sobre a neuropatologia da DA, como a angiogênese cerebral e o aumento do *clearance* amilóide nos plexos coróides (Foster et al., 2011). Uma vez que as placas amilóides podem ser formadas tanto no parênquima neuronal quanto vascular, uma hipoperfusão sangüínea no cérebro também é evidenciada na DA (Austin et al., 2011). Foi demonstrado que o exercício aumenta a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), resultando no surgimento de novos capilares no cérebro, restaurando a perfusão cerebral (Foster et al., 2011). Considerando estes resultados em conjunto, é sustentado que o exercício pode atuar aumentando a “reserva cognitiva” e a “reserva metabólica”, auxiliando na manutenção da adaptação neuronal a perturbações decorrentes do envelhecimento e neurodegeneração (Stranaham e Mattson, 2012). Alguns autores cunharam estes eventos como “efeitos farmacômiméticos” do exercício (Stranaham et al., 2009).

Por fim, outros estudos apontam que o exercício possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, e que estes podem ser mecanismos de proteção conferidos pelo exercício contra a DA (Radak et al., 2010; Woods et al., 2012).

3. Exercício físico e estresse oxidativo

O estresse oxidativo é estabelecido em condições em que o balanço entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes é desequilibrado em favor da primeira (Sies, 1986). O estresse oxidativo está implicado com a fisiopatologia de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, câncer e doenças neurodegenerativas (Radak et al., 2008).

O oxigênio é considerado uma molécula paradoxal, pois é vital para a produção energética através da fosforilação oxidativa mitocondrial em seres vivos aeróbios, ao passo que seu consumo gera substâncias tóxicas, capazes

de gerar danos em estruturas celulares e subcelulares. Estas substâncias são conhecidas como radicais livres (RL) e são produzidas durante reações metabólicas oxidativas (Cooper et al., 2002). No entanto, os RL também possuem funções biológicas importantes, participando de respostas imunes, detoxificação de xenobióticos, sinalização intracelular, neurotransmissão e vasodilatação (Valko et al., 2007; Radak et al., 2008).

Em condições fisiológicas, cerca de 85-90% do oxigênio molecular é utilizado pelas mitocôndrias e o restante (10-15%) sofre oxidação direta ou é utilizado por oxidases e oxigenases (Halliwell e Gutteridge, 1999). Ademais, cerca de 2 a 5% do oxigênio molecular utilizado na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial não sofre redução tetravalente, dando origem ao radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Parte do oxigênio pode também ser reduzido univalentemente, gerando outros intermediários, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}). O $O_2^{\cdot-}$ e o OH^{\cdot} são radicais livres por definição, por possuírem um elétron desemparelhado na sua estrutura orbital, ao passo que o H_2O_2 é um não-radical parcialmente reduzido, capaz de gerar OH^{\cdot} ao reagir com íons Cu^+ e Fe^{+2} durante a reação de Fenton (Halliwell e Cross, 1994). O radical OH^{\cdot} é o mais reativo dos intermediários, por ser capaz de reagir com diversas biomoléculas e não possuir defesa antioxidante enzimática (Halliwell e Gutteridge, 1999). Estes intermediários são considerados coletivamente espécies reativas (RS), os quais desestruturam moléculas de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em inativação enzimática, danos em membranas plasmáticas e alteração do DNA celular (Halliwell e Cross, 1994). Em verdade, pequenos níveis de RS e lesões oxidativas são encontrados em condições fisiológicas (Halliwell e Cross, 1994). Estes níveis são mantidos dentro de limites estreitos pela ação de sistemas de defesa antioxidante, presentes em todas as células do organismo e que podem ser divididos em enzimáticos e não-enzimáticos (Yu, 1994). As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). A SOD é responsável pela detoxificação do $O_2^{\cdot-}$ através de reação de dismutação, sendo encontrada principalmente em duas isoformas: mitocondrial (MnSOD) e citosólica (CuZnSOD). A CAT elimina o H_2O_2 , reduzindo-o à água. A GPx também desempenha importante papel na detoxificação do H_2O_2 , convertendo a glutatona reduzida (GSH) à glutatona

oxidada (GSSG), formando água (Halliwell e Gutteridge, 1999). As defesas antioxidantes não-enzimáticas incluem compostos endógenos como a glutatona, ceruloplasmina, hormônios sexuais, melatonina e compostos exógenos como os tocoferóis, ácido ascórbico, carotenóides e flavonóides obtidos através da dieta ou suplementação (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009; Gomes et al., 2012).

O exercício agudo induz a produção de RS, devido ao aumento do consumo de O_2 e à ativação de reações fisiológicas durante e após a interrupção do esforço (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009). Por exemplo, durante o exercício há um aumento da demanda energética muscular que resulta em acréscimo de até 100 vezes no fluxo sanguíneo dos músculos ativos, assim como ocorre uma elevação de 10-15% no consumo de O_2 corporal total (Banerjee et al., 2003). Ademais, em condições de repouso, o fluxo eletrônico mitocondrial gera 1% de $O_2^{\cdot-}$, com este valor aumentando em 10-15% durante o exercício (Halliwell e Gutteridge, 1999). A produção de RS e estresse oxidativo induzidos pelo exercício agudo estão relacionados a fatores como idade, estado nutricional e intensidade relativa do esforço, com estes eventos sendo mais ocorrentes em protocolos de exaustão (Gomes et al., 2012). A formação de RS pode ocorrer tanto durante o exercício, como no período pós-exercício (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009), e alguns de seus mecanismos são ilustrados pela figura 5. Estes mecanismos incluem primeiramente: (1) aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ através do vazamento de elétrons no transporte eletrônico mitocondrial; (2) auto-oxidação de catecolaminas; (3) metabolismo de prostanóides; (4) fenômeno de isquemia-reperfusão decorrentes dos eventos cíclicos musculares sobre a vasculatura, gerando hipóxia (estresse redutivo) seguida de reoxigenação (explosão radicalar); (5) ativação da via da xantina oxidase. Estes mecanismos ocorrem durante a realização do exercício e são seguidas de outros mecanismos durante o período pós-exercício, provenientes de microlesões por estresse mecânico e de reação inflamatória local subsequente: (6) explosão respiratória fagocítica; (7) desequilíbrio na homeostase do cálcio; (8) destruição de proteínas contendo-ferro (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009). Cabe ressaltar que estes mecanismos dependem do tipo de exercício e ocorrem a nível periférico. Exercícios estáticos geram mais mecanismos de isquemia-

reperusão e mais ativações metabólicas induzidas por estresse mecânico, ao passo que exercícios dinâmicos, principalmente os de natureza aeróbia demandam maior fluxo sanguíneo e, portanto, induzem formação de RS pelo aumento do consumo de O_2 e pelo estresse de cisalhamento nas paredes arteriais (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009). Uma produção de RS também ocorre diretamente no cérebro, e está relacionado ao aumento dos níveis da dopamina em resposta ao exercício. A oxidação da dopamina por monoaminas oxidases resulta na formação de H_2O_2 (Aksu et al., 2009).

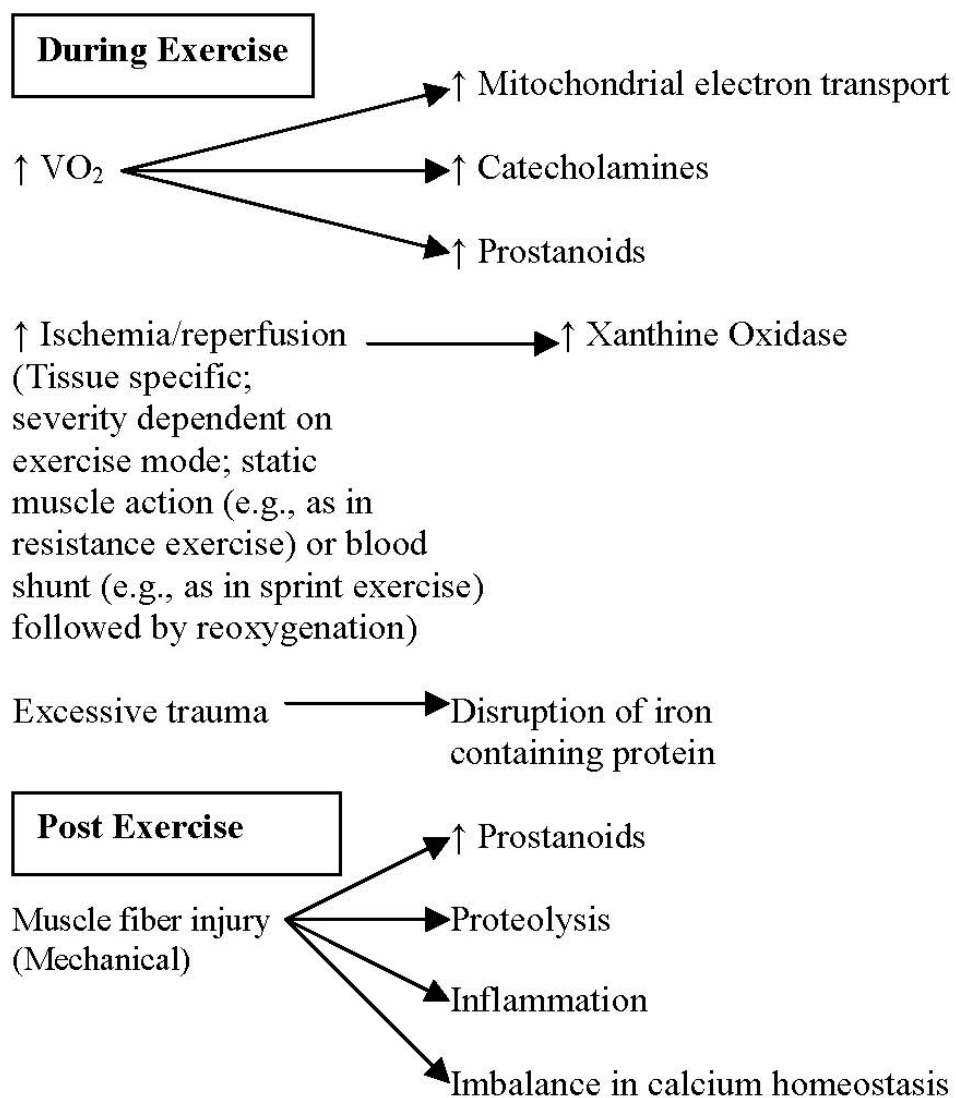


Figura 5: Mecanismos da produção de RS induzida pelo exercício.

Fonte: Fisher-Wellman e Bloomer (2009).

Em contrapartida, o exercício crônico é capaz de causar adaptações no sentido de amplificar a capacidade antioxidante em diversas células e tecidos corporais, como músculo esquelético, coração, fígado e cérebro de animais exercitados (Banerjee et al., 2003; Radak et al., 2008). Tanto as defesas antioxidantes enzimáticas quanto não-enzimáticas em diversos tecidos sofrem importante adaptação frente ao exercício (agudo e crônico), sobretudo as enzimas SOD e CAT e o sistema da glutathione (Ji, 2000). Estudos epidemiológicos demonstraram que o exercício físico regular pode aumentar a expectativa de vida e reduzir a incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Radak et al., 2008). Em humanos, foi mostrado que a atividade eritrocitária e músculo-esquelética das enzimas SOD e GPx e a capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) são superiores em indivíduos atletas em comparação com indivíduos destreinados, protegendo contra a peroxidação lipídica mensurada no plasma (Marzatico et al. 1997; Schneider et al., 2005).

Nesse contexto, a propriedade antioxidante do exercício pode ser compreendida com base em princípios horméticos. A teoria da hormesis postula que a exposição repetida a toxinas ou estressores traz benefícios ao corpo, aumentando o desempenho fisiológico e a saúde física (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009). Em toxicologia, *hormesis* é um fenômeno de dose-resposta, caracterizado por uma estimulação a baixas doses e inibição a altas doses de exposição a um tóxico, que pode ser representado por uma curva com formato de U invertido (Radak et al., 2008). Nesse particular, o exercício agudo atua como um estressor estimulante ao aumentar a geração de RS, onde exposições repetidas ao exercício (treinamento físico) provocam adaptações no sentido de ativar e causar uma supra-regulação dos sistemas antioxidantes biológicos (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009). Do ponto de vista mecanístico, a resposta hormética exercício-induzida deve-se ao fato de as células de mamíferos serem dotadas de rotas de sinalização sensíveis ao estado redox intracelular e que podem ser ativadas pelo estresse oxidativo (Ji et al., 2006). Em outras palavras, as RS geradas pelo exercício servem de sinal para a ativação de proteínas quinases como a MAPK (p38 e ERK1 e ERK2), que por sua vez ativam o fator nuclear kappa-B (NFkB), o qual pode aumentar a expressão gênica de enzimas antioxidantes. De fato, várias enzimas antioxidantes contêm receptores para o NFkB e, portanto, são alvos potenciais

para a regulação ascendente ativada pelo exercício (Ji et al., 2006). Por último, o aumento dos níveis de RS também está relacionado às adaptações específicas do tecido muscular ao treinamento físico, como a angiogênese, a biogênese mitocondrial e a hipertrofia muscular (Gomes et al., 2012).

Em repouso, o cérebro representa aproximadamente 20% e 25% do consumo total de oxigênio e glicose do corpo respectivamente, assim como representa 14-20% da distribuição relativa do débito cardíaco (Ter-Minassian, 2006). O cérebro é especialmente susceptível a danos oxidativos, devido ao seu alto consumo de O₂, altos níveis de ferro livre e lipídios poli-insaturados, associadamente aos seus baixos níveis de enzimas antioxidantes comparados a outros tecidos (Ter-Minassian, 2006). Radak et al. (2008) afirmam que apesar do fluxo cerebral de O₂ ser relativamente constante durante uma atividade física, o desafio oxidativo induzido pelo exercício evoca adaptações específicas, como aumento da atividade de enzimas antioxidantes e reparadoras de lesões teciduais, assim como diminuição dos danos oxidativos – o qual, em última análise, provoca um aumento da resistência ao estresse oxidativo. Estes autores também reportam que a melhoria da função cognitiva está relacionada à diminuição de marcadores de carbonilação protéica, lipoperoxidação e danos ao DNA no cérebro de roedores submetidos a treinamento físico. Somani et al. (1994) verificaram que um treinamento em esteira com aumento progressivo de intensidade elevou a atividade da enzima SOD no tronco cerebral e estriado de ratos. Outras evidências mostraram que o exercício crônico atenuou o estresse oxidativo em modelos animais de isquemia cerebral (Cechetti et al., 2012), epilepsia (Souza et al., 2009), doença de Parkinson (Lau et al., 2011) e traumatismo cerebral em ratos (Mota et al., 2011). Em um modelo de DA induzido por infusão i.c.v. de streptozotocina (STZ), Rodrigues et al. (2010) demonstraram que o treinamento em esteira com intensidade moderada restaurou os níveis de glutathione no hipocampo de ratos. Um et al. (2011) mostraram que camundongos Tg-NSE/PS2m submetidos a treinamento em esteira com baixa intensidade e longa duração por 3 meses tiveram a expressão de SOD 1 e SOD 2 aumentada no hipocampo. Outros marcadores de estresse oxidativo ligados à DA também podem ser afetados pelo exercício, como verificado por García-Mesa et al. (2011). Estes autores encontraram diminuição da peroxidação lipídica,

aumento da atividade da GPx e aumento dos níveis de GSH no córtex de camundongos com transgenia tripla para DA (3x-Tg-AD) após 6 meses de livre acesso a rodas de correr. Estes resultados foram paralelos à diminuição do déficit cognitivo, melhoria da função sensório-motora e diminuição da ansiedade.

Em resumo, o exercício regular é capaz de gerar adaptações nas defesas antioxidantes endógenas, seguindo princípios horméticos. Nesse particular, embora tenha sido reportado o efeito positivo do treinamento de alta intensidade sobre parâmetros de estresse oxidativo em roedores (Ogonovszky et al., 2005), o treinamento físico quando executado de forma intensa e prolongada, acompanhado de períodos de recuperação e dieta insatisfatórios, pode provocar um aumento das lesões oxidativas e perda da performance atlética (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009). Em geral, a resposta dos sistemas antioxidantes cerebrais ao treinamento físico são tecido-específicas, dependem da configuração do protocolo de exercício e da responsividade das diferentes regiões cerebrais (Ji, 2000). Em modelos animais, estudos mostraram um efeito positivo do exercício sobre o estado redox de estruturas como hipocampo e córtex frontal, as quais são regiões implicadas com a memória e a função executiva. Ademais, tem sido demonstrado que o exercício é eficaz em atenuar o estresse oxidativo em diversos modelos animais de insultos pró-oxidantes e doenças, incluindo a DA. Devido à preservação da funcionalidade dos neurônios, ao mitigar o estresse oxidativo, é muito provável que um dos mecanismos protetivos do exercício sobre a função cognitiva seja o seu efeito estimulador das defesas antioxidantes. Em última análise, ao aumentar os níveis de RS o exercício pode também, modular indiretamente os níveis de BDNF, CREB e sinapsina, ativando rotas de sinalização redox-sensíveis destes fatores de crescimento (Radak et al., 2008).

4. Exercício Físico e Neuroinflamação

O termo neuroinflamação vem sendo utilizado para denotar uma inflamação específica no sistema nervoso central (SNC), que não reproduz as características da inflamação periférica, mas que produz eventos neurodegenerativos, como depósito amilóide, neurite distrófica e fosforilação da

proteína tau (Streit et al., 2004). Infecções, traumas, toxinas e outros estímulos são capazes de ativar o sistema imune inato no SNC. Esta resposta neuroinflamatória ativa as micróglia, que liberam mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas. Além disso, estes mediadores podem produzir estresse oxidativo, levando a um estado neuroinflamatório crônico, perpetuando o ciclo inflamatório (Frank-Cannon et al., 2009). Este estado crônico de inflamação no cérebro está relacionado a várias patologias neurodegenerativas, como doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e a DA (Frank-Cannon et al., 2009). No que se refere à DA, as placas amilóides causam a ativação das micróglia, que liberam citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β . Estas citocinas estão relacionadas à tauopatias e à indução de apoptose (Streit et al., 2004).

Foi demonstrado que o exercício regular pode diminuir o risco de desenvolver doenças crônico-degenerativas, e apregoa-se que isto seja decorrente do seu efeito anti-inflamatório, aumentando a resiliência celular aos eventos tóxicos inflamação-induzidos (Stranahan et al., 2012). Gleesom et al. (2011) sugerem que este efeito anti-inflamatório do exercício ocorra através de 4 mecanismos principais: (1) diminuição da gordura visceral; (2) aumento da liberação de hormônios imunomoduladores; (3) aumento da liberação de citocinas anti-inflamatórias; (4) diminuição da expressão de receptores tipo-toll (TLR) em células imunológicas. Conforme estes autores, a gordura visceral está relacionada ao desenvolvimento de doenças metabólicas e degenerativas, como hipertensão e diabetes tipo II. Isto se deve em parte pela secreção crônica de TNF- α e outras adipocinas tóxicas, levando a um estado sistêmico de inflamação crônica de baixo grau. O exercício pode mobilizar e oxidar esta gordura, atrofiando estes adipócitos e reduzindo a inflamação sistêmica. Um episódio de exercício agudo estimula o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, liberando na corrente sangüínea os hormônios adrenalina e cortisol, que além de função metabólica, também possuem ação imunoregulatória. Tanto o cortisol quanto a adrenalina podem inibir a produção de TNF- α pelas células imunes. Além disso, o cortisol possui atividade anti-inflamatória potente (Gleesom et al., 2011). Ademais, o exercício agudo induz a produção e liberação de mioquinas, que são citocinas produzidas pela contração muscular, tais como a interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e interleucina (IL-15)

(Petersen e Pedersen, 2005). Ou seja, o exercício pode ativar uma cascata de produção de citocinas e proteínas imunomoduladoras, através da produção inicial da IL-6 (Petersen e Pedersen, 2005), como demonstrado pela figura 5.

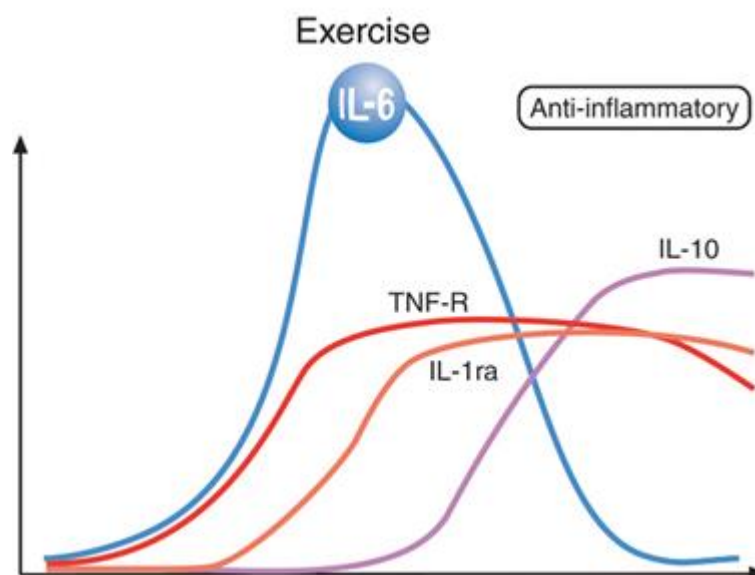


Figura 5: Cascata de citocinas induzida pelo exercício, com o surgimento de moduladores anti-inflamatórios no plasma durante o esforço físico.

Eixo Y: níveis de citocinas anti-inflamatórias; Eixo X: tempo de exercício. IL-6: interleucina-6; TNF-R: receptor solúvel do fator de necrose tumoral-alfa; IL-1ra: antagonista dos receptores de interleucina-1; IL-10: interleucina-10.

Fonte: Petersen e Pedersen, 2005.

A IL-6 pode influenciar vários tecidos não-musculares e pode, inclusive, atravessar a barreira hemato-encefálica e atuar a nível central (Pervaiz e Hoffman-Goetz, 2011). A IL-6 provoca o aparecimento da interleucina-10 (IL-10) no plasma, o qual é uma citocina anti-inflamatória clássica. A IL-10 é secretada principalmente por linfócitos auxiliares T-CD4+ e inibe a produção de TNF- α , IL-1 β e de proteínas quimiotáticas, limitando as respostas inflamatórias agudas. A IL-6 também evoca a liberação do antagonista dos receptores de interleucina 1 (IL-1ra) e do receptor solúvel de TNF (sTNF- α), os quais inibem a produção de TNF- α e IL-1, respectivamente. O IL-1ra liga-se a receptores de IL-1 de células imunes, sem induzir resposta intracelular, inibindo a transdução de sinal responsável pela produção de IL-1 (Pervaiz e Hoffman-Goetz, 2011). A produção de IL-10 pode também ser aumentada, através da formação de RS

exercício-induzida, já que cascatas de sinalização redox-sensíveis também são responsáveis pela síntese de IL-10 (Woods et al., 2012). Adicionalmente, o exercício pode diminuir a expressão de receptores tipo-toll (TLR) em monócitos. A ativação destes receptores está relacionada a cascatas de sinalização inflamatória e é um importante mecanismo de modulação da inflamação sistêmica (Gleesom et al., 2011). Os mecanismos anti-inflamatórios exercício-induzidos estão ilustrados pela figura 6.

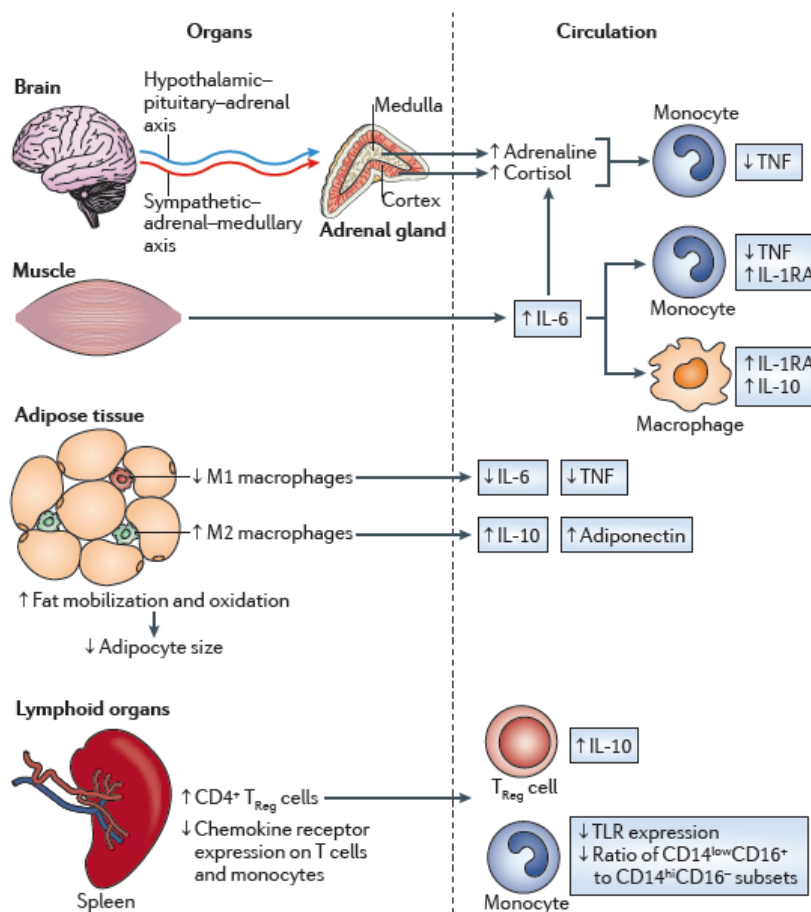


Figura 6. Potenciais mecanismos anti-inflamatórios do exercício.

TNF: fator de necrose tumoral; IL-1RA: antagonista dos receptores de interleucina-1; IL-6: interleucina 6; IL-10: interleucina-10; CD4⁺ T_{reg} cells: linfócitos T-CD4⁺ reguladores; TLR: receptores tipo-toll; CD14^{low}CD16⁺: monócitos inflamatórios; CD14^{high}CD16⁻: monócitos clássicos.

Fonte: Gleesom et al. (2011)

Desta forma, consecutivos episódios de exercício podem atuar de forma imunoregulatória, reduzindo os níveis de neuroinflamação. Este efeito neuroprotetor foi confirmado em modelos de camundongos transgênicos para DA (Leem et al., 2011; Parachikova et al., 2008; Nichol et al., 2008), onde o exercício realizado em esteira e rodas de correr foi eficaz em reduzir os níveis de marcadores inflamatórios no hipocampo, com estes resultados ocorrendo em conjunto com a melhoria da função cognitiva. Importaneamente, Nichol et al. (2008) verificaram que os níveis de TNF- α e IL-1 β foram diminuídos no hipocampo de camundongos Tg2576 após 3 semanas de acesso a roda de correr, concomitantemente com a diminuição dos níveis hipocampais do peptídeo A β ₁₋₄₀.

Em síntese, é possível perceber que vários estudos demonstraram um efeito positivo do exercício sobre a função cognitiva em humanos e modelos animais, com estes benefícios sendo encontrados tanto em indivíduos saudáveis quanto em indivíduos acometidos por DA. No entanto, as bases moleculares pelo qual o exercício atua ainda necessitam serem mais bem investigadas, sobretudo no que se refere aos efeitos antioxidante e anti-inflamatórios do exercício. Na literatura pode-se verificar que existem diversos protocolos de exercício em diferentes tipos de transgenia para DA em camundongos, como exercício em esteira e rodas de correr. No entanto, não foi encontrado um estudo que utilizasse a natação como forma de exercício. Não obstante, não foi encontrado na literatura trabalhos que estudassem o efeito do exercício em modelo de DA induzida por A β ₁₋₄₀ em camundongos.

Em vista disso, é importante a realização de estudos que investiguem o efeito do treinamento de natação sobre marcadores de estresse oxidativo e neuroinflamação em modelos animais para DA, a fim de fornecer mais evidências sobre o papel neuroprotetor do exercício.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar o efeito neuroprotetor do exercício de natação em um modelo de doença de Alzheimer induzido por infusão intracerebroventricular do peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos Swiss Albinos.

Objetivos Específicos

Analisar as memórias de curto e longo prazo através do teste de reconhecimento de objetos nos animais sedentários e treinados, após administração do peptídeo $A\beta_{1-40}$.

Determinar a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, GR e GST no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais sedentários e treinados, após administração do peptídeo $A\beta_{1-40}$.

Determinar os níveis de RS e NPSH no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais sedentários e treinados, após administração do peptídeo $A\beta_{1-40}$.

Determinar os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais sedentários e treinados, após administração do peptídeo $A\beta_{1-40}$.

Comparar o desempenho cognitivo e os níveis de marcadores de estresse oxidativo e neuroinflamação no hipocampo e córtex pré-frontal entre os animais sedentários e treinados, após administração do peptídeo $A\beta_{1-40}$.

PARTE II

Neuroprotective effect of physical exercise in a mouse model of

Alzheimer's disease induced by β -amyloid₁₋₄₀ peptide

Leandro C. Souza, Carlos B. Filho, André T.R. Goes, Lucian Del Fabbro,
Marcelo G. de Gomes, Lucielli Savegnago, Mauro Schneider Oliveira, Cristiano

R. Jesse

Submetido à Neurotoxicity Research.

Submission confirmation

Neurotoxicity Research: Manuscript Number Assigned

De: [Neurotoxicity Research \(NTRE\)](#)

Para: [Cristiano Jesse](#)

Sep 22, 2012

Dear Dr. Jesse,

Your submission entitled "Neuroprotective effect of physical exercise in a mouse model of Alzheimer's disease induced by β-amyloid1-40 peptide" has been assigned the following manuscript number: NTRE-D-12-00118.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

<http://ntre.edmgr.com/>

Thank you for submitting your work to Neurotoxicity Research.

Kind Regards,

Sincerely,

Richard M. Kostrzewa

Editor, Neurotoxicity Research

Richard M. Kostrzewa, Ph.D., Dr.h.c.
Professor, Department of Pharmacology
Quillen College of Medicine
East Tennessee State University
PO Box 70577
Johnson City, TN 37614-1708
Tel.: +1 423 439-6321
Fax: +1 423 439-8773
kostrzew@etsu.edu

Neuroprotective effect of physical exercise in a mouse model of Alzheimer's disease induced by β -amyloid₁₋₄₀ peptide

Leandro C. Souza¹, Carlos B. Filho¹, André T.R. Goes¹, Lucian Del Fabbro¹,
Marcelo G. de Gomes¹, Lucielli Savegnago², Mauro Schneider Oliveira³,
Cristiano R. Jesse^{1*}

¹ Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – LaftamBio Pampa – Universidade Federal do Pampa, Itaqui, RS, Brazil

² Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Unidade Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

³ Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da saúde, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

*Correspondence should be sent to:

Cristiano R. Jesse

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – *LaftamBio Pampa* – Universidade Federal do Pampa, CEP 97650-000, Itaqui, RS, Brazil.

Phone and FAX number: 0-55-34331669

Abstract

This study was designed to investigate the potential neuroprotective effect of exercise in a mouse model of Alzheimer's disease (AD) induced by intracerebroventricular (i.c.v.) injection of beta-amyloid₁₋₄₀ (A β ₁₋₄₀) peptide. For this aim, male Swiss Albino mice were submitted to swimming training (ST) with progressive increase in intensity and duration for 8 weeks before A β ₁₋₄₀ administration (400pmol/animal; 3 μ l/site, i.c.v. route). The cognitive behavioural, oxidative stress and neuroinflammatory markers in hippocampus and prefrontal cortex of mice were assessed 7 days after A β ₁₋₄₀ administration. Our results demonstrated that ST was effective in preventing impairment in short and long-term memories in the object recognition test. ST attenuated the increased levels of reactive species and decreased non-protein thiol levels in hippocampus and prefrontal cortex induced by A β ₁₋₄₀. Also, A β ₁₋₄₀ inhibited superoxide dismutase activity and increased glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in hippocampus and prefrontal cortex – alterations that were mitigated by ST. In addition, ST was effective against the increase of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta levels and the decrease of interleukin-10 levels in hippocampus and prefrontal cortex. The present study confirmed the hypothesis that exercise is able to protect against some mechanisms of A β ₁₋₄₀-induced neurotoxicity. In conclusion, we suggest that exercise can prevent the cognitive decline, oxidative stress, and neuroinflammation induced by A β ₁₋₄₀ in mice supporting the hypothesis that exercise can be used as a non-pharmacological tool to reduce the symptoms of AD.

Key words: Alzheimer's disease, exercise, A β ₁₋₄₀ peptide, cognitive impairment, oxidative stress, neuroinflammation.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a chronic degenerative disorder clinically characterized by gradual and progressive decline in memory (Bateman et al. 2012). In 2006 about 26.6 million people worldwide suffered from AD, and it has been estimated an increase of up to 106.8 million people by 2050 (Lautenschlager et al. 2012). From the histological standpoint the presence of both senile plaques and neurofibrillary tangles are pathological hallmarks of AD brain (Ballard et al. 2011). Senile plaques are primarily composed of a β -amyloid ($A\beta$) peptide (a 38-43 amino acids peptide), in which their central role in the pathophysiology of AD has been extensively demonstrated (Haass and Strooper 1999; Takeda et al. 2009; Palop and Mucke 2010). In particular, $A\beta$ deposition in extracellular plaques is related to synaptic dysfunction, neuroapoptosis, and memory loss (Hardy et al. 2006; Ballard et al. 2011). Although the mechanisms of $A\beta$ -induced neurotoxicity remain unclear, it has been considerably demonstrated that the aggregates of $A\beta$ peptides in brain induce oxidative stress and neuroinflammation (Tarawneh and Holtzman 2010; Verri et al. 2012).

In fact, studies have suggested that oxidative stress and neuroinflammation are involved in etiopathogenesis of AD (Nunomura et al. 2006; Piermartini et al. 2010; Verri et al. 2012). Several studies have demonstrated that intracerebroventricular (i.c.v.) injection of $A\beta_{1-40}$ peptide mimicked some signs of AD in mice inducing oxidative stress (Prediger et al. 2007; Piermartini et al. 2010), neuroinflammation (Medeiros et al. 2010; Piermartini et al. 2010; Passos et al. 2010) as well as impaired cognitive function (Prediger et al. 2007; Medeiros et al. 2010; Passos et al. 2010; Piermartini et al. 2010; Santos et al. 2012). The administration of $A\beta_{1-40}$ is related to the induction of free radical damages (Piermartini et al. 2010; Santos et al. 2012) and alterations in antioxidant defenses such as glutathione depletion in prefrontal cortex and hippocampus in Swiss Albino mice (Prediger et al. 2007). Nevertheless, deregulated inflammatory responses are a key process implicated to the development of chronic neurodegenerative diseases including Parkinson's disease (PD) and AD (Leem et al. 2011). For instance, previous data have showed that brain levels of proinflammatory cytokines such

as tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin 1-beta (IL-1 β) are elevated in human patients with AD (Tupo and Arias 2005; Leem et al. 2011).

Exercise has been showed to be a promising non-pharmacological approach to reduce the risk of AD (Ballard et al. 2011; Pang and Hannan 2012). It has been demonstrated that exercise can both improve and alleviate memory loss in elderly (Kramer et al. 2006). Additionally, it has been reported that cardiorespiratory capacity was inversely related to cognitive impairment, cerebral atrophy, and progression to dementia in AD patients (Vidoni et al. 2011). Despite the biological and molecular basis for such benefits are inconclusive, it has been suggested that the antioxidant and anti-inflammatory properties of physical exercise contribute for neuroprotection (Banerjee et al. 2003; Gleesom et al. 2011; Stranahan et al. 2012). Evidences has been shown that chronic exercise attenuated oxidative stress in animal models of cerebral ischemia (Cechetti et al. 2012), seizure (Souza et al. 2009), and PD (Lau et al. 2011) as well as mitigated neuroinflammation in traumatic brain injury in rats (Mota et al. 2012). In transgenic mouse models of AD, physical exercise protocols improved memory (Parachikova et al. 2008; García-Mesa et al. 2011; Liu et al. 2011; Um et al. 2011;), reduced inflammation (Parachikova et al. 2008) and apoptosis markers (Um et al. 2011), increased the expression of antioxidant enzymes in hippocampus (Um et al. 2011), as well as reduced amyloid deposition in cerebral cortex (Yuede et al. 2009). On the other hand, no studies were found regarding the effect of physical exercise on AD-induced by acute infusion of A β peptide into the rodent brain.

Thus, we sought to investigate the potential neuroprotective effect of physical exercise training in hippocampus and prefrontal cortex of mice exposed to A β ₁₋₄₀ peptide. For this purpose, in this study we verified if a swimming exercise program could protect against cognitive impairment induced by i.c.v. injection of A β ₁₋₄₀. In addition, we investigated the potential protective effect of swimming exercise training against oxidative stress and neuroinflammation induced by i.c.v. injection of A β ₁₋₄₀ in hippocampus and prefrontal cortex. Swimming was chosen as paradigm of exercise training since there is a lack of studies in literature concerning the impact of swimming training protocols on mouse models of AD. Moreover, swim is a natural behaviour of

rodents and imposes less mechanical stress due to water thrust and recruitment of different muscles (Jolitha et al., 2006).

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Experiments were performed using male Swiss Albino mice (30-45g, 2-4 months old). Animals were maintained at 22-25°C with free access to water and food, under a 12:12h light/dark cycle, with lights on at 7:00 a.m. All manipulations were carried out during light phase on the day. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. The procedures of this study were conducted according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animals Resources and with the approval of Ethical Committee for Animal Use (CEUA protocol # 012/2012) of Federal University of Pampa, Brazil.

2.2 Experimental design

Mice were randomly assigned into four groups (n=10 per group): (1) sedentary vehicle; (2) sedentary A β ₁₋₄₀; (3) exercise vehicle and (4) exercise A β ₁₋₄₀. In this experimental design, exercise groups were submitted to swimming training (ST) for 8 weeks with a progressive increase of both intensity and time. Sedentary groups were maintained in physical inactivity. After 24h of last bout of ST, mice received intracerebroventricular (i.c.v.) injection of A β ₁₋₄₀ or vehicle. Seven days after i.c.v. injection, mice underwent cognitive behavioural tests for 2 days and, finally, submitted to euthanasia. The hippocampus, prefrontal cortex and quadriceps femoris muscle were removed for assays (figure 1).

2.3 Swimming training (ST) protocol

Mice in the exercise groups were submitted to an 8-week ST program, adapted from Huang et al. (2010) (Table 1). In the first week, mice were acclimatized to the unfamiliar activity (swimming adaption period-SAP) in 250-L water-filled tank with the temperature kept at 31° ± 2°C, in order to decrease the stress of swimming activity. In the SAP, animals could swim or stand in the tank

with water depth of 5cm. In the beginning of the second week, water deep was increased to 20cm, so that the hind limbs of the animals could not reach the bottom of the tank. Progressively, larger weights were attached to the proximal portions of animal's tails in order to increase the exercise intensity; the weights were 0-3%, in correspondence to body weight (BW) (Table 1). This intensity is considered below to anaerobic threshold for swimming training, in which was demonstrated by literature that workloads of up to 6% BW for rats (Gobatto et al. (2001) and 4% BW for mice (Almeida et al. 2011) can be considered 'sub-threshold' and is indicated to improvement of aerobic capacity (Gobatto et al. 2001). The ST bouts were performed five times per week, and animals swam individually in group of 10 animals, separated by opaque acrylic boards. After each daily ST bouts, animals were towel dried and placed near a heater until the hair dried.

2.4 I.c.v. injection of A β ₁₋₄₀

A β ₁₋₄₀ peptide (Tocris, Ellisville, MO, USA) was prepared as stock solution at a concentration of 1mg/ml in sterile 0.1M phosphate-buffered saline (PBS) (pH7.4) and aliquots were stored at -20°C. A β ₁₋₄₀ solution was aggregated by incubation at 37°C for 4 days before use, as described previously (Prediger et al., 2007). Of particular importance, Santos et al. (2012) recently confirmed by polyacrylamide gel electrophoresis that incubation of A β ₁₋₄₀ peptide at 37°C for 4 days was effective in propitiate A β ₁₋₄₀ aggregation. The aggregated form of A β ₁₋₄₀ (400pmol/mouse) or PBS (vehicle) was administered by i.c.v. route, using a microsyringe with a 28-gauge stainless-steel needle 3.0 mm long (Hamilton) according to previously described by Prediger et al. (2007) and Piermatini et al. (2010). Briefly, mice were anesthetized with intraperitoneal (i.p.) injection of sodium pentobarbital (0.067mg/g). Under light anesthesia, the needle was inserted unilaterally 1mm to the right of the midline point equidistant from each eye, at an equal distance between the eyes and the ears and perpendicular to the plane of the skull. The injection volume (3 μ l/site) of A β ₁₋₄₀ or PBS was delivered gradually. The injection placement or needle track was visible and was verified at the time of dissection. To further confirm if the coordinates of i.c.v. injection were correct, two mice in each group were

submitted to dye injection (Evans blue dye, 0.5 μ l) into the ventricles (Davisson et al. 1998).

2.5 Behavioural assessment

2.5.1 Open-field test (OFT)

The open-field apparatus was made of a plastic box with 30 cm height walls. The floor of the apparatus, 45 cm in length and 45 cm in width, was divided by masking tape markers into 9 squares (3 rows of 3). Each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 4 min to record the locomotor activity. To assess the spontaneous locomotor behaviour, was computed the number of segments crossed with the four paws (Walsh and Cummins 1976).

2.5.2 Object recognition test (ORT)

In this ORT mice were placed in an open box (similar to OFT) in order to evaluate the preference for a novel object, where the short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) could be assayed. The ORT was performed as described by Ennaceur and Delacour (1988) with some modifications.

Mice were allowed to explore two identical objects (sample phase) for 5 min and then returned to their home cage. To evaluate the short-term memory, mice were returned to the open box, after a delay of 90 min, where they were exposed to two different objects (test phase), one identical to the one previously encountered in the sample phase, therefore now familiar, and the other is novel. The animals were allowed to explore both objects for more 5 min. After each trial, box and objects were cleaned with 70% ethanol. To evaluate the long-term memory (LTM), mice were tested in same conditions with a delay of 24h after sample phase.

The positions of the objects in the test and the objects used as novel or familiar were counterbalanced between the animals. Exploratory behaviour was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Any other behaviour, such as sitting on or turning around the object was not considered as exploration. The amount of time each animal spent actively investigating the objects was manually scored and discrimination index was

calculated as the time exploring novel or familiar object divided by the total time spent exploring both objects.

2.6 Tissue preparation

After behavioural tests, mice were euthanized with barbiturate overdose (pentobarbital sodium 150mg/kg; i.p. route). Hippocampus and prefrontal cortex were removed and rapidly homogenized in 50mM Tris-Cl, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 2,400×g for 15 min at 4 °C and a fresh low-speed supernatant fraction (S₁) was used for assays. Quadriceps femoris muscle was removed and stored at -80°C for determination of activities of citrate synthase (CS) and mitochondrial respiratory system complex (indicators of oxidative muscle capacity), in order to determine the efficacy of exercise protocol.

2.7 Biochemical Determinations

2.7.1 Reactive species (RS) levels

To determine RS levels, fresh S₁ was diluted (1:10) in 50mM Tris-Hcl (pH 7.4) and incubated with 10 µl of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA; 1mM), at 37°C for 30 min. The RS levels were determined by a spectrofluorimetric method, using DCHF-DA assay, as described by Loetchutinat et al. (2005). The DCHF-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form nonfluorescent DCFH, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of RS. DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of RS that is formed. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 30 min after the addition of DCHF-DA to the medium. The RS levels were expressed as arbitrary unit (AU).

2.7.2 Non-protein thiols (NPSH) levels

NPSH levels were determined by the method described by Ellman (1959). S₁ was precipitated with 10% trichloroacetic acid and centrifuged at 3,000×g for 10 min. Sulphydril groups were determined using clear supernatant. An aliquot of supernatant was added in 1M potassium phosphate buffer (pH 7.4) and 10 mM 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). NPSH levels were

measured spectrophotometrically at 412 nm and expressed as $\mu\text{mol NPSH/g}$ tissue.

2.7.3 Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was assayed spectrophotometrically according to the method described by Misra and Fridovich (1972). This method is based on the capacity of SOD in inhibiting autoxidation of epinephrine to adrenochrome. Aliquots of S_1 were added in a sodium carbonate (Na_2CO_3) buffer (50 mM; pH 10.3) and the enzymatic reaction was initiated by adding epinephrine (1 mM). The color reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50 % at 26 °C. The enzymatic activity was expressed as Units (U)/mg protein.

2.7.4 Catalase (CAT) activity

CAT activity in S_1 was measured spectrophotometrically by the method proposed by Aebi (1984), which involves monitoring the disappearance of H_2O_2 in the presence of S_1 at 240 nm. Enzymatic reaction was initiated by adding S_1 and the substrate H_2O_2 (0.3 mM) in a medium containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required for monitoring the disappearance of H_2O_2 . The enzymatic activity was expressed as Units (U)/mg protein (1U decomposes $1\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}$ at pH 7 at 25 °C).

2.7.5 Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity in S_1 was assayed spectrophotometrically by the method described by Wendel (1981), through the GSH/NADPH/glutathione reductase system, by the dismutation of H_2O_2 at 340 nm. S_1 was added to the medium containing GSH/NADPH/glutathione reductase system and the enzymatic reaction was initiated by adding H_2O_2 (4 mM). In this assay, the enzyme activity was indirectly measured by means of NADPH decay. H_2O_2 is reduced and generates GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by glutathione reductase present in the assay media at the expenses of NADPH. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

2.7.6 Glutathione reductase (GR) activity

GR activity was determined spectrophotometrically as described by Calberg and Mannervick (1985). In this assay, GSSG is reduced by GR at the expense of NADPH consumption, which was followed at 340 nm. GR activity is proportional to NADPH decay. An aliquot of S_1 was added in the system containing 0.15 M potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1.5 mM EDTA, 0.15 mM NADPH. After the basal reading, the substrate (GSSG 20 mM) was added. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

2.7.7 Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed through the conjugation of GSH with CDNB at 340 nm as described by Habig et al. (1974). An aliquot of S_1 was added in a medium containing 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4). After that, 100 mM CDNB and GSH were added to the medium. CDNB was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein.

2.7.8 Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) levels

Levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in the hippocampus and prefrontal cortex were determined using commercially available ELISA assays, following the instructions supplied by the manufacturer (DuoSet Kits, R&D Systems; Minneapolis). Results are shown as pg/mg tissue.

2.8 Aerobic metabolism assay

2.8.1 Citrate synthase (CS) activity

CS activity was measured from quadriceps femoris using commercially available citrate synthase activity assay kit (Sigma Aldrich). Briefly, muscle tissue from each animal was homogenized in an extraction buffer (50 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 7.4). After centrifugation at 13,000 rpm for 1min at 4°C, aliquots of supernatants were used for the measurement of the enzyme activity. The activity of CS was expressed as units/mg protein.

2.8.2 Mitochondrial respiratory complex activities

Quadriceps femoris muscle was homogenized in 50mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.3 M sucrose, 5mM MOPS, 1 mM EGTA and 0.1% bovine serum albumin. The homogenates were centrifuged at 1,000×g for 10 min at 4°C. The supernatant was centrifuged at 15,000×g in order to concentrate mitochondria in the pellet, which was finally dissolved in the same buffer (Latini et al. 2005). Complex-I activity (NADH dehydrogenase) was measured by the rate of NADH-dependent ferricyanide reduction rate at 420 nm (Cassina and Rade 1996). Activity of complex-II (succinate dehydrogenase) was measured by following reduction of 2,6-dichloroindophenol by succinate during 120s (Fischer et al. 1985). Activity of complex-IV (cytochrome c oxidase) was measured by following the oxidation of the reduced cytochrome c at 550 nm during 30s (Wharton and Tzagoloff 1967). The activities of the respiratory chain complexes were expressed as nmol/min/mg protein.

2.9 Protein determination

Protein content was measured colorimetrically according to the method of Bradford (1976) and bovine serum albumin (1 mg/ml) was used as standard.

2.10 Statistical analysis

Results were presented as means \pm S.E.M. Comparisons between experimental and control groups were performed by one-way (exercise = independent variable) or two-way ANOVA ($A\beta_{1-40}$ \times exercise treatments = independent variables) followed by Duncan test when appropriate. A value of $p \leq 0.05$ was considered to be significant. All tests and plotting graphics were executed using the GraphPad prism 5 software (San Diego, CA, U.S.A.)

3. Results

3.1 Assessment of muscle oxidative metabolism

The adaptation of skeletal muscle oxidative capacity is considered a good mark of exercise training efficacy (Wibom et al. 1992). Citrate synthase (CS) activity is routinely used as a marker of aerobic capacity and mitochondrial density in skeletal muscle in experiments with rodents (Mann et al., 2010) and humans (Leek et al. 2001; Love et al. 2011). In light of this, the activities of CS and mitochondrial respiratory system complex were assayed in mitochondrial isolated from quadriceps femoris in order to assay the efficacy of exercise training protocol.

One-way ANOVA revealed that exercise increased significantly CS ($F_{1,12} = 25.98$, $p < 0.05$; **fig. 2A**) and complex-I ($F_{1,12} = 40.04$, $p < 0.05$; **fig. 2B**) but not complex II ($F_{1,12} = 0.24$, $p = 0.6408$; **fig. 2B**) and complex-IV ($F_{1,12} = 0.32$, $p = 0.5851$; **fig. 2B**) activities in trained animals in relation to sedentary animals.

3.2 Behavioral assessment

3.2.1 Exploratory activity in ORT and locomotor activity in OFT

Two-way ANOVA revealed that total time exploration in ORT was not changed significantly by $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,28} = 0.25$; $p = 0.6204$), exercise ($F_{1,28} = 1.60$; $p = 0.2169$) and $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,28} = 0.10$; $p = 0.7535$) (**fig. 3A**).

Statistical analysis of the number of crossings performed in OFT was not changed significantly by $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,28} = 0.31$; $p = 0.5812$), exercise ($F_{1,28} = 0.88$; $p = 0.3554$] and $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,28} = 0.16$; $p = 0.6882$) (**fig. 3B**).

3.2.2 Short-term memory (STM) in ORT

Two-way ANOVA of cognitive performance in the ORT yielded a significant $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,28} = 13.03$; $p < 0.05$) and a main effect of exercise $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,28} = 4.34$; $p < 0.05$) (**fig. 4A**). Post hoc comparisons demonstrated that animals in the sedentary/ $A\beta_{1-40}$ group showed a reduction in recognition index when compared to that of animals in sedentary/ PBS group, exhibiting $A\beta_{1-40}$ -induced impairment on STM. Physical exercise protected against STM impairment caused by $A\beta_{1-40}$, improving the recognition index in ORT.

3.2.3 Long-term memory in ORT

Statistical analysis of cognitive performance in the ORT revealed a significant $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,28} = 7.83$; $p < 0.05$) and a main effect of exercise ($F_{1,28} = 35.36$; $p < 0.05$) and $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,28} = 68.43$; $p < 0.05$) (**fig. 4B**). Post hoc comparisons demonstrated that injection of $A\beta_{1-40}$ reduced recognition index in sedentary mice, promoting impairment on LTM. Exercise prevented against LTM impairment elicited by $A\beta_{1-40}$, improving the recognition index in LTM. In addition, exercise itself improved LTM, represented by increased recognition index.

3.3 Biomarkers of oxidative stress

3.3.1 NPSH and RS levels

Two-way ANOVA of NPSH levels in hippocampus showed a significant $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,20} = 8.30$ $p < 0.05$) and a main effect of exercise ($F_{1,20} = 10.36$; $p < 0.05$) and $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,20} = 9.35$; $p < 0.05$) (**fig. 5A**). Post hoc comparisons demonstrated that $A\beta_{1-40}$ significantly decreased NPSH levels in hippocampus of sedentary mice. Exercise restored NPSH levels in hippocampus of exercise/ $A\beta_{1-40}$ group, at the levels of sedentary/PBS group.

Statistical analysis of NPSH levels in prefrontal cortex yielded a significant $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,20} = 6.20$; $p < 0.05$) and a main effect of exercise ($F_{1,20} = 10.24$; $p < 0.05$) and $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,20} = 20.26$; $p < 0.05$) (**fig. 5B**). Post hoc comparisons demonstrated that $A\beta_{1-40}$ significantly decreased NPSH levels in prefrontal cortex of sedentary mice. Physical exercise protected against the decrease of NPSH levels caused by $A\beta_{1-40}$.

Two-way ANOVA of RS levels in hippocampus demonstrated a significant $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,20} = 14.59$; $p < 0.05$) and a main effect of $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,20} = 10.84$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons revealed that $A\beta_{1-40}$ significantly increased RS levels in hippocampus of mice. Physical exercise prevented the increase of RS levels caused by $A\beta_{1-40}$ (**fig. 5C**).

Statistical analysis of RS levels in prefrontal cortex revealed a significant $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,20} = 16.62$; $p < 0.05$) and a main effect of $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,20} = 15.82$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons demonstrated that $A\beta_{1-40}$ significantly increased RS levels in prefrontal cortex of mice. Physical exercise prevented the increase of RS levels caused by $A\beta_{1-40}$ (**fig. 5D**).

3.3.2 SOD and CAT activities

Two-way ANOVA of SOD activity in hippocampus yielded a significant $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,20} = 0.01$; $p < 0.05$) and a main effect of exercise ($F_{1,20} = 12.97$; $p < 0.05$) and $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,20} = 34.15$; $p < 0.05$) (**fig. 6A**). Post hoc comparisons demonstrated that $A\beta_{1-40}$ significantly decreased SOD activity in hippocampus of mice. Physical exercise protected against decrease of SOD activity caused by $A\beta_{1-40}$. In addition, exercise itself increased SOD activity in hippocampus of mice.

A significant $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,20} = 50.51$; $p < 0.05$) and a main effect of exercise ($F_{1,20} = 21.78$; $p < 0.05$) and $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,20} = 52.21$; $p < 0.05$) in prefrontal cortex SOD activity of mice was observed (**fig. 6B**). Post hoc comparisons demonstrated that $A\beta_{1-40}$ significantly decreased SOD activity in prefrontal cortex of mice. Exercise protected against SOD activity inhibition caused by $A\beta_{1-40}$. In addition, exercise itself increased SOD activity in prefrontal cortex of mice.

Two-way ANOVA showed that CAT activity in hippocampus of mice was not changed significantly by $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,20} = 1.22$; $p = 0.2822$), exercise ($F_{1,20} = 0.74$; $p = 3993$) and $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,20} = 0.07$; $p = 0.7922$) (**fig. 6C**).

Two-way ANOVA revealed that CAT activity in prefrontal cortex of mice was not modified significantly by $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,20} = 0.59$; $p = 0.4520$), exercise ($F_{1,20} = 0.02$; $p = 6542$) and $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,20} = 0.02$; $p = 0.8849$) (**fig. 6D**).

3.3.3 GR activity

Two-way ANOVA of GR activity in hippocampus demonstrated a significant $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,16} = 14.23$; $p < 0.05$) and a main effect of $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,16} = 26.92$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons revealed that $A\beta_{1-40}$ significantly increased GR activity in hippocampus of sedentary mice. Exercise prevented the increase of GR activity caused by $A\beta_{1-40}$ (**fig. 7A**).

Statistical analysis of GR activity in prefrontal cortex revealed a significant $A\beta_{1-40} \times$ exercise interaction ($F_{1,16} = 9.40$; $p < 0.05$) and a main effect of $A\beta_{1-40}$ ($F_{1,16} = 23.80$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons demonstrated that $A\beta_{1-40}$

40 significantly increased GR activity in prefrontal cortex of mice. Physical exercise prevented the increase of GR activity caused by A β ₁₋₄₀ (**fig. 7B**).

3.3.4 GPx activity

Two-way ANOVA of GPx activity in hippocampus demonstrated a significant A β ₁₋₄₀ \times exercise interaction ($F_{1,16} = 54.43$; $p < 0.05$) and a main effect of A β ₁₋₄₀ ($F_{1,16} = 38.89$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons revealed that A β ₁₋₄₀ significantly increased GPx activity in hippocampus of sedentary mice. Physical exercise prevented the increase of GPx activity caused by A β ₁₋₄₀ (**fig. 7C**).

Statistical analysis of GPx activity in prefrontal cortex yielded a significant A β ₁₋₄₀ \times exercise interaction ($F_{1,16} = 43.19$; $p < 0.05$) and a main effect of A β ₁₋₄₀ ($F_{1,16} = 24.72$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons demonstrated that A β ₁₋₄₀ significantly increased GPx activity in prefrontal cortex of sedentary mice. Physical exercise prevented the increase of GPx activity caused by A β ₁₋₄₀ (**fig. 7D**).

3.3.5 GST activity

Two-way ANOVA of GST activity in hippocampus showed a significant A β ₁₋₄₀ \times exercise interaction ($F_{1,20} = 17.15$; $p < 0.05$) and a main effect of A β ₁₋₄₀ ($F_{1,20} = 66.37$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons revealed that A β ₁₋₄₀ significantly increased GST activity in hippocampus of sedentary mice. Exercise prevented the increase of GST activity caused by A β ₁₋₄₀ (**fig. 7E**).

Statistical analysis of GST activity in prefrontal cortex revealed a significant A β ₁₋₄₀ \times exercise interaction ($F_{1,20} = 2.26$ $p < 0.05$) and a main effect of A β ₁₋₄₀ ($F_{1,20} = 41.83$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons demonstrated that A β ₁₋₄₀ significantly increased GST activity in prefrontal cortex of sedentary mice. Physical exercise prevented the increase of GST activity caused by A β ₁₋₄₀ (**fig. 7F**).

3.4 Biomarkers of neuroinflammation

3.4.1 TNF- α and IL-1 β (proinflammatory cytokines) levels

Two-way ANOVA of TNF- α levels in hippocampus demonstrated a significant A β ₁₋₄₀ \times exercise interaction ($F_{1,16} = 12.29$; $p < 0.05$) and a main effect of A β ₁₋₄₀ ($F_{1,16} = 91.97$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons revealed that

A β ₁₋₄₀ significantly increased TNF- α levels in hippocampus of sedentary mice. Exercise prevented the increase of TNF- α levels caused by A β ₁₋₄₀ (**fig. 8A**).

Statistical analysis of TNF- α levels in prefrontal cortex revealed a significant A β ₁₋₄₀ \times exercise interaction ($F_{1,16} = 11.55$; $p < 0.05$) and a main effect of A β ₁₋₄₀ ($F_{1,16} = 74.90$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons demonstrated that A β ₁₋₄₀ significantly increased TNF- α levels in prefrontal cortex of sedentary mice. Exercise prevented the increase of TNF- α levels caused by A β ₁₋₄₀ (**fig. 8B**).

Two-way ANOVA of IL-1 β levels in hippocampus showed a significant A β ₁₋₄₀ \times exercise interaction ($F_{1,16} = 41.18$; $p < 0.05$) and a main effect of A β ₁₋₄₀ ($F_{1,16} = 127.60$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons revealed that A β ₁₋₄₀ significantly increased IL-1 β levels in hippocampus of sedentary mice. Exercise prevented the increase of IL-1 β levels caused by A β ₁₋₄₀ (**fig. 8C**).

Statistical analysis of IL-1 β levels in prefrontal cortex yielded a significant A β ₁₋₄₀ \times exercise interaction ($F_{1,16} = 27.66$; $p < 0.05$) and a main effect of A β ₁₋₄₀ ($F_{1,16} = 192.30$; $p < 0.05$). Post hoc comparisons demonstrated that A β ₁₋₄₀ significantly increased IL-1 β levels in prefrontal cortex of sedentary mice. Exercise prevented the increase of IL-1 β levels caused by A β ₁₋₄₀ (**fig. 8D**).

3.4.2 IL-10 (anti-inflammatory cytokine) levels

Two-way ANOVA of IL-10 levels in hippocampus yielded a significant A β ₁₋₄₀ \times exercise interaction ($F_{1,16} = 8.78$; $p < 0.05$) and a main effect of exercise ($F_{1,16} = 87.35$; $p < 0.05$) and A β ₁₋₄₀ ($F_{1,16} = 63.38$; $p < 0.05$) (**fig. 8E**). Post hoc comparisons demonstrated that A β ₁₋₄₀ significantly decreased IL-10 levels in hippocampus of sedentary mice. Exercise significantly restored IL-10 levels in exercise/A β ₁₋₄₀ group. In addition, exercise itself significantly increased IL-10 in hippocampus of mice.

A significant A β ₁₋₄₀ \times exercise interaction ($F_{1,16} = 0.58$; $p < 0.05$) and a main effect of exercise ($F_{1,16} = 38.02$; $p < 0.05$) and A β ₁₋₄₀ ($F_{1,16} = 49.55$; $p < 0.05$) in prefrontal cortex IL-10 levels of mice was observed (**fig. 8F**). Post hoc comparisons demonstrated that A β ₁₋₄₀ significantly decreased IL-10 levels in prefrontal cortex of sedentary mice. Physical exercise significantly restored IL-10 levels in exercise/A β ₁₋₄₀ group. In addition, exercise itself significantly increased IL-10 in hippocampus of mice.

4. Discussion

According to the validation protocol of Takeda et al. (2009) the acute i.c.v. injection of synthetic amyloid peptides such as A β ₁₋₄₀ (analogous to peptides found in senile plaques in AD patients) has been a profitable experimental model for the characterization of A β -neurotoxicity and the study of neuroprotective interventions. In the present study, our results were similar and complementary to previous studies (Prediger et al. 2007; Piermartini et al. 2010; Medeiros et al. 2010; Passos et al. 2010; Santos et al. 2012) and extend the notion of neurotoxic effects of A β ₁₋₄₀ peptide in mice. We observed in literature that effect of ST on AD-like deficits in animal models is scarce or absent. Thus, we resort to ST in order to investigate the protective role of this kind of exercise in a mouse model of AD. ST is considered an effective exercise protocol to enhance muscle oxidative capacity and promotes adaptation to physical training in rodents similar to those observed in human beings. Likewise, swim is a natural ability of rodents and ST lacks the presence of electric stimulus as stress factor (Contarteze et al. 2008).

Here, we confirmed the hypothesis that exercise is able to protect against some mechanisms of A β ₁₋₄₀-induced neurotoxicity. Our findings demonstrated that an 8-week ST with low intensity was effective in preventing cognitive impairment induced by i.c.v. injection of A β ₁₋₄₀ peptide. We also demonstrated that ST protected both hippocampus and prefrontal cortex of mice against oxidative stress and neuroinflammation caused by A β ₁₋₄₀ exposure.

4.1 Swimming training protected against cognitive impairment elicited by A β ₁₋₄₀

To assess the cognitive behaviour of mice we resort to the ORT. This test is considered well-suited to study the effect of exercise on cognition and it does not involve strong aversive elements such as foot shock delivered during fear conditioning or food deprivation (Hopkins and Bucci 2010). ORT exploits the natural tendency of animals to explore novel stimuli in preference to familiar stimuli, and it is used to evaluate declarative memory. Indeed, the object recognition is implicated with perirhinal cortex and hippocampal function and it has shown to be impaired in patients with chronic neurodegenerative disorders such as AD (Winters et al. 2008).

Our data demonstrated that 7 days after surgery, the A β ₁₋₄₀ peptide induced short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) impairment in sedentary mice revealed by the reduction of recognition index in ORT. This finding corroborates the recent study of Santos et al. (2012), wherein A β ₁₋₄₀ administration caused in a significant decline in the capacity of recognize a novel object in Swiss male mice. In contrast, ST protected against cognitive impairment induced by A β ₁₋₄₀, preserving STM and LTM, revealed by preventing reduction of recognition index in ORT. Moreover, our results demonstrated that exercise/PBS group obtained higher recognition index than the sedentary/PBS group in LTM task, showing that ST itself had effect on cognitive function. Overall, using ST as protocol of exercise, our study provided evidences that trained mice were more able to discriminate between novel and familiar object than sedentary mice. It is important to emphasize that no significant changes were found in number of crossings in the open field test (OFT) and total exploration time in ORT in any of the groups ensuring that the locomotor activity did not change neither by ST nor by A β ₁₋₄₀.

Our results are in agreement with studies supporting that exercise can prevent cognitive decline and improve memory in humans (Kramer et al. 2006; Ballard et al. 2011; Lautenschlager et al. 2012). In animal experimental models, it has already been demonstrated that exercise can improve cognitive performance under several conditions. Liu et al. (2011), for instance, have showed that treadmill-running training prevented decline in spatial memory during Water maze test in the APP/PS1 transgenic mouse model of AD. Considering ORT, Yuede et al. (2009) have showed that both voluntary exercise (16 weeks of wheel running) and forced exercise (16 weeks of treadmill running) improved the performance in recognition of novel object in the Tg2576 mouse model of AD. An improvement in the object recognition memory induced by exercise training was also demonstrated in healthy rats (García-Capdevilla et al. 2009; Hopkins and Bucci, 2010), which utilized wheel running as paradigm of exercise. Our results are complementary to aforementioned studies, indicating that ST is an effective kind of exercise to protect against cognitive deficits elicited by A β ₁₋₄₀ peptide or even improve memory in healthy subjects.

4.2 Swimming training alleviated oxidative stress in the hippocampus and prefrontal cortex

There are strong evidences that oxidative stress is implicated with pathophysiology of AD (Nunomura et al. 2007; Piermartini et al. 2010). Our results have demonstrated that 7 days after a single dose of A β ₁₋₄₀ (400 pmol/mouse; i.c.v. route), the RS levels in prefrontal cortex and hippocampus of sedentary mice exposed to this peptide were increased. In addition, we found a decrease in NPSH levels in hippocampus and prefrontal cortex of sedentary animals exposed to A β ₁₋₄₀. Our findings are similar with previous studies that demonstrated an increase in lipid peroxidation and a decrease in glutathione levels in hippocampus and prefrontal cortex of mice caused by i.c.v. injection of A β ₁₋₄₀ (Prediger et al. 2007; Piermartini et al. 2010) . In the present study, both increase in RS levels and decrease in NPSH levels induced by A β ₁₋₄₀ in these brain structures were attenuated by ST. The reduction of RS levels found in this study is relevant since augmented RS levels and associated damages have been implicated as primary factors associated with AD (Squier, 2001). Another relevant result was the protective effect of ST on NPSH levels. The GSH (which comprises 90% of NPSH) plays an important role protecting cells from oxidative stress, detoxifying xenobiotics and RS, as well as being considered the main intracellular redox buffer (Schafer and Buettner 2001). It has been reported that A β may cause severe depletion of GSH, leading to a reduction in synaptic density (Prediger et al. 2007). Thus, our study demonstrated that exercise may protect against this neurotoxic mechanism of A β on cellular redox state of brain. Similar results were reported by García-Mesa et al. (2011), where voluntary running wheel reduced lipid peroxidation and increased GSH levels in cerebral cortex of 3xTg-AD mice. Moreover, there are reports which sustain that regular exercise evokes specific adaptations in the brain tissue enhancing resistance to oxidative stress such as reduction in RS levels and increased NPSH levels (Souza et al. 2009), as well as increased antioxidant enzyme activity and reduced oxidative damages in rodents (Radak et al. 2001; 2008).

In the present study, the oxidative stress in hippocampus and prefrontal cortex was also characterized by alterations in the antioxidant enzymes. Sedentary mice exposed to A β ₁₋₄₀ had an inhibition of the SOD activity, which is an antioxidant enzyme involved in detoxification of superoxide anion radical.

This result is consistent with the findings of Bagheri et al. (2011) which reported that intrahippocampal injection of A β ₁₋₄₀ induced a reduction in the SOD activity in the hippocampus of rats. Furthermore, a recent *in vitro* study indicated a direct inhibition of the SOD activity by A β ₁₋₄₀ peptide (Oyatsi and Whiteley 2012). In our study, we also demonstrated that the activity of CAT remained unaltered in all groups. This can be explained partly due to the lower levels of CAT naturally found in the brain (Aksu et al. 2009). In contrast, GPx, GR and GST activities were increased in sedentary mice exposed to A β ₁₋₄₀ compared to the sedentary/PBS group. These results are in agreement with the study of Prediger et al. (2007). These authors found an increase in GR and GPx activities in hippocampus and prefrontal cortex of Swiss albino mice caused by A β ₁₋₄₀ administered by i.c.v. route. Moreover, they supported that the increased activities of GPx and GR could possibly reflect an adaptive attempt to counteract oxidative damages induced by this peptide. Additionally, we suggest that effect on glutathione enzymes occurred in response to the inhibition of the SOD activity. Apart from the direct ROS generation, with the lower activity of SOD there is less detoxification of superoxide anion. This free radical may lead to a reduction of free forms of iron and copper which, in turn, may enhance the production of hydroxyl radical by Fenton and Haber-Weiss reactions perpetuating the oxidative stress cycle.

The present study demonstrated that ST for 8 weeks prevented the inhibition of the SOD activity and the increase in GR, GPx and GST activities induced by A β ₁₋₄₀ in hippocampus and prefrontal cortex. We also found that ST itself enhanced the SOD activity of these brain structures in exercise/PBS group compared with sedentary/PBS group. Corroborating our results, Um et al. (2011) demonstrated that treadmill-running for 3 weeks increased the expression of two isoforms of the SOD enzyme (SOD-1 and SOD-2) in hippocampus of Tg-NSE/PS2m mice. Accordingly, Devi and Kiran (2004) found an increase of SOD activity in hippocampus and cerebral cortex of healthy rats after 4 months of swimming exercise training with low intensity. The antioxidant protection of exercise is based on the hormetic principle. It means that low exposures to toxins and other stressors promote favorable organic adaptations, enhancing physiological performance and improving health (Ji et al. 2006). Thus, acute exposures to exercise are inducers of oxidative stress, where

chronic exposure is required for the upregulation of antioxidant defenses. Indeed, the generation of RS is enhanced during exercise mainly due to an increase in the oxygen consumption, to reductive stress coming from the cyclic events of muscle contraction (ischemia-reperfusion), and to the activation of the xanthine oxidase (Bloomer and Goldfarb 2004). RS play an important role in the mechanism whereby exercise confers antioxidant protection (Ji et al. 2006). In brief, RS appear to serve as the “signal” for the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (p38 and ERK1/ERK2) which, in turn, activates the nuclear factor- κ B (NF κ B) which enhance the gene expression of antioxidant enzymes. Several of these enzymes contain NF κ B binding sites in the promoter region, and they can be potential targets for exercise-activated upregulation via the NF κ B signaling pathway (Ji et al. 2006).

In the light of our results, we have suggested that up-regulation effect of ST on NPSH levels and SOD activity was a causative event to the prevention of increased levels of ROS and increased GPx, GR and GST activities induced by A β ₁₋₄₀ peptide. Thus, our study demonstrated that exercise may act by preventing an important pathophysiological mechanism of AD.

4.3 Swimming training attenuated neuroinflammation in the hippocampus and prefrontal cortex

Neuroinflammation is a key process in the neuropathogenesis of AD and involves the release from the activated glia of a number of neurotoxic molecules such as RS and cytokines (Murgas et al. 2012). Excessive levels of proinflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β are apt to induce neuronal damage through a variety of mechanisms in AD, including the generation of free oxygen radicals (Zhao et al. 2011). Under physiological conditions these cytokines are expressed at low levels in the brain, but they can be induced by insults resulting in neurodegeneration (Passos et al. 2010). Accordingly, Passos et al. (2010) explain that A β deposition may activate microglia and astrocytes which consequently release TNF- α and IL-1 β . In addition, Medeiros et al. (2010) have reported that TNF- α is an important mediator of the A β -induced inflammatory response and cognitive impairment. Supporting these reports, our data clearly demonstrated that i.c.v. injection of A β ₁₋₄₀ induced an expressive rise in TNF- α and IL-1 β levels in hippocampus and prefrontal cortex of sedentary mice. On

the other hand, we found that ST protected against this A β ₁₋₄₀-induced proinflammatory effect reinforcing reports that have shown anti-inflammatory effects of exercise (Gleeson et al. 2011; Stranaham et al. 2012). Our results also corroborate previous data wherein chronic exercise attenuated neuroinflammation in the hippocampus of transgenic mouse of AD (Parachikova et al. 2008) and transgenic mouse model of tauopathies (Leem et al. 2011). In the study of Leem et al. (2011) a significant reduction in the expression of TNF- α and IL-1 β in the brain of tau-transgenic mouse model was verified after treadmill training. One of the mechanisms whereby exercise regulates inflammation is through the increased production and release of anti-inflammatory cytokines from contracting skeletal muscle, such as IL-10 (Gleeson et al. 2011). These authors explained that IL-10 appears to downregulate or completely inhibits the expression of several pro-inflammatory cytokines and other soluble mediators, such as TNF- α and IL-1 β . Synthesized in the CNS, IL-10 is implicated with the limitation of the symptoms of AD and with promoting the survival of neurons and all glial cells in the brain by blocking the effects of cytokine apoptosis-inducing signals and by promoting the activation of cell survival signaling pathways (Strle et al. 2001). Furthermore, *in vitro* studies have shown that IL-10 suppressed A β ₁₋₄₂-induced inflammatory cytokine production in murine microglia (Szczepanik et al. 2001). In the current study, we found that the levels of IL-10 in hippocampus and prefrontal cortex of mice were expressively modulated by ST. The decrease in IL-10 levels induced by A β ₁₋₄₀ was prevented by ST preserving IL-10 levels in these structures at the same levels of the sedentary/PBS group. Furthermore, hippocampus and prefrontal cortex levels of IL-10 were markedly higher in exercise/PBS group than in sedentary/PBS group. Altogether, these findings clearly demonstrated that ST was effective in alleviating neuroinflammation and conferred anti-inflammatory effect against A β ₁₋₄₀ in brain of mice. By preventing an inflammatory response, ST reduced RS levels by an indirect antioxidant mechanism. Therefore, the anti-inflammatory property of exercise could represent an additional mechanism of protection against A β ₁₋₄₀-induced neurotoxicity.

5. Conclusions

The present study demonstrated that an 8-week ST with low intensity was effective in attenuating the following impairments resulting from A β ₁₋₄₀ exposure in mice: (1) impairment on STM and LTM in the ORT; (2) increased RS levels and decreased NPSH levels in hippocampus and prefrontal cortex; (3) inhibition of the SOD activity and rise in GPx, GR and GST activities in hippocampus and prefrontal cortex; and (4) increased TNF- α and IL-1 β levels and reduced IL-10 levels in hippocampus and prefrontal cortex. In view of our results, we indicated that ST acting as a neuroprotective agent. By up-regulating mainly NPSH levels, SOD activity and IL-10 levels, ST mitigated the neurotoxic effect of A β ₁₋₄₀, and hence protecting against memory disfunction induced by this peptide. These findings reinforce that one of the effects induced by exercise on cognition is due to antioxidant and anti-inflammatory properties. By reason of A β ₁₋₄₀ paradigm is an useful experimental model to mimic early memory deficits in AD without inducing pathological AD hallmarks, such as amyloid plaques and phospho-tau positive cells (Takeda et al. 2009), we suggest that exercise training may protect against early toxic events A β -induced that preceding amyloid accumulation.

Only a few studies have focused on the effect of exercise on object recognition memory in mouse models of AD (Richter et al. 2008; Yuede et al. 2009). Moreover, the most studies used treadmill running or voluntary exercise (wheel running) as exercise paradigm to investigate the protective role of physical exercise on AD-like deficits. Here, utilizing a ST with low intensity we have showed that the trained/A β ₁₋₄₀ group significantly explored more novel object than the sedentary/ A β ₁₋₄₀ group, indicating that this kind of exercise may be a useful intervention to counteract A β -induced cognitive impairment. Furthermore, it was the first time that the effect of exercise was studied in a mouse model of AD induced by i.c.v. injection of A β ₁₋₄₀.

In conclusion, we suggest that exercise may prevent the cognitive decline, oxidative stress, and neuroinflammation induced by A β ₁₋₄₀ in mice supporting the hypothesis that exercise can be used as a non-pharmacological tool to reduce the symptoms of AD.

Acknowledgments

LCS, CBF, LDF, MGG and ATRG are recipients of CAPES, FAPERGS, CNPq and PBDA/UNIPAMPA fellowships, respectively.

References

- Almeida WS, Lima LC, Cunha VN, Cunha RR, Araújo RC, Barros CC, Simões HG, Campbell CS (2011) Assessment of aerobic capacity during swimming exercise in ob/ob mice. *Cell Biochem Funct* 29:666-672.
- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105:121-126.
- Aksu I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O (2009) Effect of acute and chronic exercise on oxidant–antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett* 452:281-285.
- Bagheri M, Joghataei MT, Mohseni S, Roghani M (2011) Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid $\beta_{(1-40)}$ rat model of alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 113:49-62.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E (2011) Alzheimer's disease. *Lancet* 377:1019-1031.
- Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S (2003) Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem* 253:307-312.
- Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC (2012) Clinical and biomarker changes in dominantly inherited alzheimer's disease. *N Engl J Med* 367:795-804.

- Bloomer RJ, Goldfarb AH (2004) Anaerobic exercise and oxidative stress: A review. *Can J Appl Physiol* 29:245-263.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Carlberg I, Mannervik B (1985) Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113:484-490.
- Cassina A, Radi R (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328:309–316.
- Cechetti F, Worm PV, Elsner VR, Bertoldi K, Sanches E, Bem J, Siqueira IR, Netto CA (2012) Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 97:90-96.
- Contarteze RVL, Manchado FDB, Gobatto CA, De Mello MAR (2008) Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 151:415–422.
- Davisson RL, Yang G, Beltz TG, Cassell MD, Johnson AK, Sigmund CD (1998) The brain renin-angiotensin system contributes to the hypertension in mice containing both the human renin and human angiotensinogen transgenes. *Circ Res* 83:1047-1058.
- Devi SA, Kiran TR (2004) Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary Vitamin E in aging rat brain. *Neurobiol Aging* 25:501-508.

- El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD (1996) Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. *Nature* 382:716-719.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70-77.
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behav Brain Res* 31:47-59.
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23-36.
- García-Capdevila S, Portell-Cortés I, Torras-Garcia M, Coll-Andreu M, Costa-Miserachs D (2009) Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behav Brain Res* 202:162-170.
- García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, LaFerla FM, Cristòfol R, Delgado-García JM, Sanfeliu C (2011) Physical exercise protects against alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *J Alzheimer Dis* 24:421-454.
- Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS (2011) The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* 11:607-615.
- Gobatto CA, De Mello MA, Sibuya CY, De Azevedo JR, Dos Santos LA, Kokubun E (2001) Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130:21-27.

- Haass C, De Strooper B (1999) The presenilins in Alzheimer's disease: proteolysis holds the key. *Science* 286:916-919.
- Habig WH, Jakoby WB (1981) Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol* 77:218-231.
- Hardy J (2006) Has the amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease been proved? *Curr Alzheimer Res* 3:71-73.
- Hopkins ME, Bucci DJ (2010) BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 94:278-284.
- Huang TH, Hsieh SS, Liu SH, Chang FL, Lin SC, Yang RS (2010) Swimming training increases the post-yield energy of bone in young male rats. *Calcif Tissue Int* 86: 142-153.
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J (2006) Exercise and hormesis activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann NY Acad Sci* 1067:425-435.
- Jolitha AB, Subramanyam MVV, Asha Devi S (2006) Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Exp Gerontol* 41:753-763.
- Kramer AF, Erickson KI, Colcombe SJ (2006) Exercise, cognition and aging brain. *J Appl Physiol* 101:1237-1242.
- Latini A, Rodriguez M, Borba RR, Scussiato K, Leipnitz G, Reis DA, Da Costa GF, Funchal C, Jacques-Silva MC, Buzin L, Giugliani R, Cassina A, Radi R, Wajner M (2005) 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. *Neuroscience* 135:111-120.

- Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO (2011) Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur J Neurosci* 33:1264-1274.
- Lautenschlager NT, Cox K, Cyarto EV (2012) The influence of exercise on brain aging and dementia. *Biochim Biophys Acta* 1822:474-481.
- Leek BT, Mudaliar SR, Henry R, Mathieu-Costello O, Richardson RS (2001) Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:441-447.
- Leem YH, Lee YL, Son HJ, Lee SH (2011) Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23. *Biochem Biophys Res Commun* 406:359-365.
- Liu HL, Zhao G, Cai K, Zhao HH, Shi LD (2011) Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res* 218:308-314.
- Loetchutinat C, Kothan S, Dechsupa S, Meesungnoen J, Jay-Gerin J, Mankhetkorn S (2005) Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Rad Phys Chem* 72:323-331.
- Love LK, LeBlanc PJ, Inglis JG, Bradley NS, Choptiany J, Heigenhauser GJ, Peters SJ (2011) The relationship between human skeletal muscle pyruvate

- dehydrogenase phosphatase activity and muscle aerobic capacity. *J Appl Physiol* 111:427-34.
- Mann PB, Jiang W, Zhu Z, Wolfe P, McTiernan A, Thompson HJ (2010) Wheel running, skeletal muscle aerobic capacity and 1-methyl-1-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis* 31:1279-1283.
- Medeiros R, Figueiredo CP, Pandolfo P, Duarte FS, Prediger RDS, Passos GF, Calixto JB (2010) The role of TNF- α signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by β -amyloid peptide. *Behav Brain Res* 209:165-173.
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247:3170-3175.
- Mota BC, Pereira L, Souza MA, Silva LFA, Magni DV, Ferreira APO, Oliveira MS, Furian AF, Mazzardo-Martins L, Da Silva MD, Santos ARS, Ferreira J, Figuera MR, Royes LFF (2010) Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical Approach. *Neurotox Res* 21:175-184.
- Murgas P, Godoy B, von Bernhardt R (2012) A β potentiates inflammatory activation of glial cells induced by scavenger receptor ligands and inflammatory mediators in culture. *Neurotox Res* 22:69-78.
- Nunomura A, Castellani RJ, Xiongwei Z, Moreira PI, Perry G, Smith MA (2006) Involvement of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:631-641.
- Oyatsi F, Whiteley CG (2012) Interaction of superoxide dismutase with the glycine zipper regions of β -amyloid peptides: Is there an implication towards

- alzheimer's disease and oxidative stress? *J Enzyme Inhib Med Chem* doi: 10.3109/14756366.2012.680063.
- Palop JJ, Mucke L (2010) Amyloid- β -induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci* 13:812-818.
- Pang TYC, Hannan AJ (2012) Enhancement of cognitive function in models of brain disease through environmental enrichment and physical activity. *Neuropharmacology* 64:515-528.
- Parachikova A, Nichol KE, Cotman CW (2008) Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *Neurobiol Dis* 30:121-129.
- Passos GF, Figueiredo CP, Prediger RDS, Silva KABS, Siqueira JM, Duarte FS, Leal PC, Medeiros R, Calixto JB (2010) Involvement of phosphoinositide 3-kinase γ in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by b-amyloid 1–40 peptide in mice. *Brain Behav Immun* 24:493-501.
- Piermartiri TCB, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, De Bem AF, Prediger RDS, Tasca CI (2010) Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β_{1-40} administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. *Exp Neurol* 226:274-284.
- Prediger RDS, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, Figueiredo, CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL (2007) Differential susceptibility following β -amyloid peptide-(1–40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between

- cognitive deficits and the glutathione system response. *Behav Brain Res* 177:205-213.
- Radak Z, Chung HY, Goto S (2008) Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med* 44:153-159.
- Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S (2001) Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* 7:90-107.
- Richter H, Ambrée O, Lewejohann L, Herring A, Keyvani K, Paulus W, Palme R, Touma C, Schäbitz WR, Sachser N (2008) Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: protection or symptom? *Behav Brain Res* 190:74-84.
- Santos DB, Peres KC, Ribeiro RP, Colle D, dos Santos AA, Moreira EL, Souza DO, Figueiredo CP, Farina M (2012) Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. *Exp Neurol* 233:767–775.
- Schafer FQ, Buettner, GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30: 1191–1212.
- Souza MA, Oliveira MS, Furian AFF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Corte LCD, Silva LFA, Retamoso LT, Corte CLD, Puntel GO, Avila DS, Soares FAA, Figuera MR, Mello CF, Royes LFFR (2009) Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 50:811–823.
- Squier TC (2001) Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp Neurol* 36:1539-1550.

- Stranaham AM, Martin B, Maudsley S (2012) Anti-inflammatory effects of physical activity in relationship to improved cognitive status in humans and mouse models of alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 9:86-92.
- Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW (2001) Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol* 21:427-429.
- Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE (2001) IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta (1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *Crit Rev Immunol* 21:427-449.
- Takeda S, Sato N, Niisato K, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Kano M, Morishita R (2009) Validation of Abeta1–40 administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease. *Brain Res.* 1280:137–147.
- Tarawneh R, Holtzman DM (2010) Biomarkers in translational research of Alzheimer's Disease. *Neuropharmacology* 59:310-322.
- Tuppo EE, Arias HR (2005) The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 37:289-305.
- Um HS, Kang EB, Koo JH, Kim HT, Lee J, Kim EJ, Yang CH, An GY, Cho IH, Cho JY (2011) Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of alzheimer's disease. *Neurosci Res* 69:161-173.
- Verri M, Pastoris O, Dossena M, Aquilani R, Guerriero F, Cuzzoni G, Venturini L, Ricevuti G, Bongiorno AI (2012) Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 25:345-353.

- Vidoni ED, Honea RA, Billinger SA, Swerdlow RH, Burns JM (2011) Cardiorespiratory fitness is associated with atrophy in alzheimer's and aging over 2 years. *Neurobiol Aging* 33:1624-1632.
- Walsh RN, Cummins RA (1976) The open-field test: a critical review. *Psychol Bull* 415:482-504.
- Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 177:325-333.
- Wharton D, Tzagoloff A (1967) Cytochrome oxidase from beef heart mitochondria. *Methods Enzymol* 10:245-250.
- Wibom R, Hultman E, Johansson M, Matherei K, Constantin-Teodosiu D, Schantz PG (1992) Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. *J Appl Physiol* 73:2004-2010.
- Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ (2008) Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1055-1070.
- Yuede CM, Zimmerman SD, Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM, Timson BF, Csernansky JG (2009) Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 35:426-432.
- Zhao J, O'Connor T, Vassar R (2011) The contribution of activated astrocytes to A β production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation* 8:150. doi:10.1186/1742-2094-8-150.

Legends of figures

Fig.1. Overview of protocol of experimental procedures.

Fig.2. Effect of 8-weeks ST on CS (A) and mitochondrial complex I, II and IV (B) activities in quadriceps femoris muscle. (n=10 per group). Values are mean \pm S.E.M. *** P<0.05 compared to sedentary (one-way ANOVA).

Fig.3. Effect of 8-weeks ST and i.c.v. injection of A β_{1-40} (400pmol/mice) on total exploration time in ORT (A) and number of crossing in OFT (B). (n=10 per group). Values are mean \pm S.E.M. (two-way ANOVA).

Fig.4. Effect of 8-weeks ST and i.c.v. injection of A β_{1-40} (400pmol/mice) on STM (A) and LTM (B). Values are mean \pm S.E.M. (n=10). *** P<0.05 when compared sedentary/A β_{1-40} with sedentary/PBS. (n=10 per group). @ P<0.05 when compared trained/PBS with sedentary/PBS. # P<0.05 when compared trained/A β_{1-40} with sedentary/A β_{1-40} (two-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

Fig.5. Effect of 8-weeks ST and i.c.v. injection of A β_{1-40} (400pmol/mice) on NPSH levels (A: hippocampus; B: prefrontal cortex) and RS levels (C: hippocampus; D: prefrontal cortex). Values are mean \pm S.E.M. (n=10 per group). *** P<0.05 when compared sedentary/A β_{1-40} with sedentary/PBS. # P<0.05 when compared trained/A β_{1-40} with sedentary/A β_{1-40} (two-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

Fig.6. Effect of 8-weeks ST and i.c.v. injection of A β_{1-40} (400pmol/mice) on activities of SOD (A: hippocampus; B: prefrontal cortex) and CAT (C: hippocampus; D: prefrontal cortex). Values are mean \pm S.E.M. (n=5 per group). *** P<0.05 when compared sedentary/A β_{1-40} with sedentary/PBS. @ P<0.05 when compared trained/PBS with sedentary/PBS. # P<0.05 when compared trained/A β_{1-40} with sedentary/A β_{1-40} (two-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

Fig.7. Effect of 8-weeks ST and i.c.v. injection of A β ₁₋₄₀ (400pmol/mice) on activities of GR (A: hippocampus; B: prefrontal cortex), GPx (C: hippocampus; D: prefrontal cortex) and GST (E: hippocampus; F: prefrontal cortex). Values are mean \pm S.E.M. (n=5 per group). *** P<0.05 when compared sedentary/A β ₁₋₄₀ with sedentary/PBS. @ P<0.05 when compared trained/PBS with sedentary/PBS. # P<0.05 when compared trained/A β ₁₋₄₀ with sedentary/A β ₁₋₄₀ (two-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

Fig.8. Effect of 8-weeks ST and i.c.v. injection of A β ₁₋₄₀ (400pmol/mice) on TNF- α levels (A: hippocampus; B: prefrontal cortex), IL-1 β levels (C: hippocampus; D: prefrontal cortex) and IL-10 levels (E: hippocampus; F: prefrontal cortex). Values are mean \pm S.E.M. (n=5 per group). *** P<0.05 when compared sedentary/A β ₁₋₄₀ with sedentary/PBS. @ P<0.05 when compared trained/PBS with sedentary/PBS. # P<0.05 when compared trained/A β ₁₋₄₀ with sedentary/A β ₁₋₄₀ (two-way ANOVA and Duncan's multiple range test).

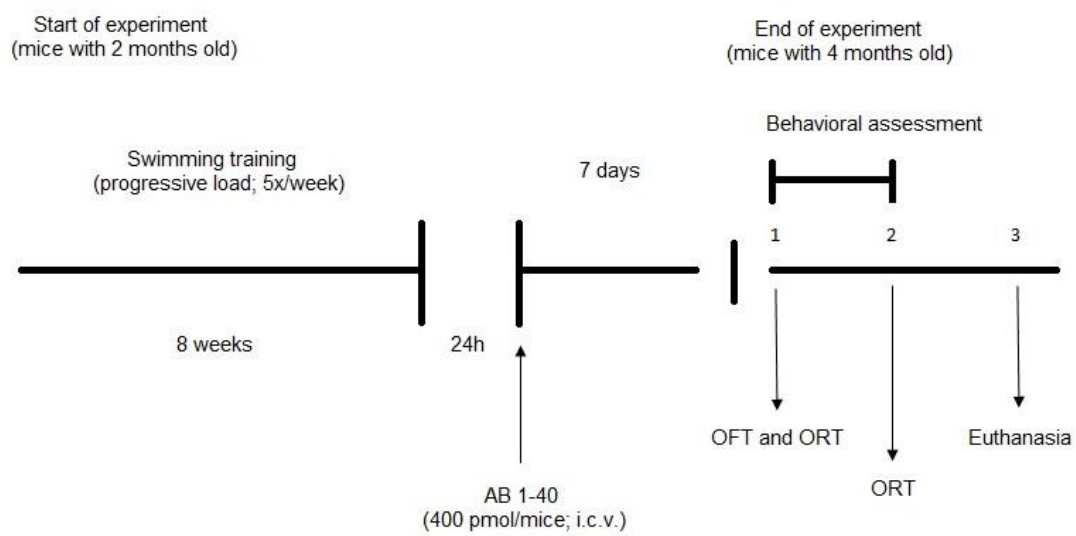


Fig. 1

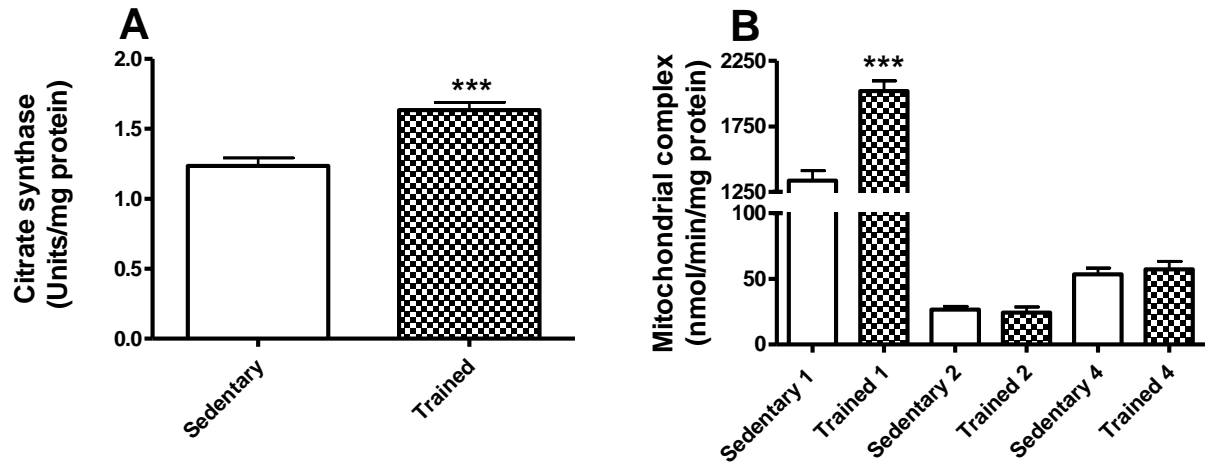


Fig. 2

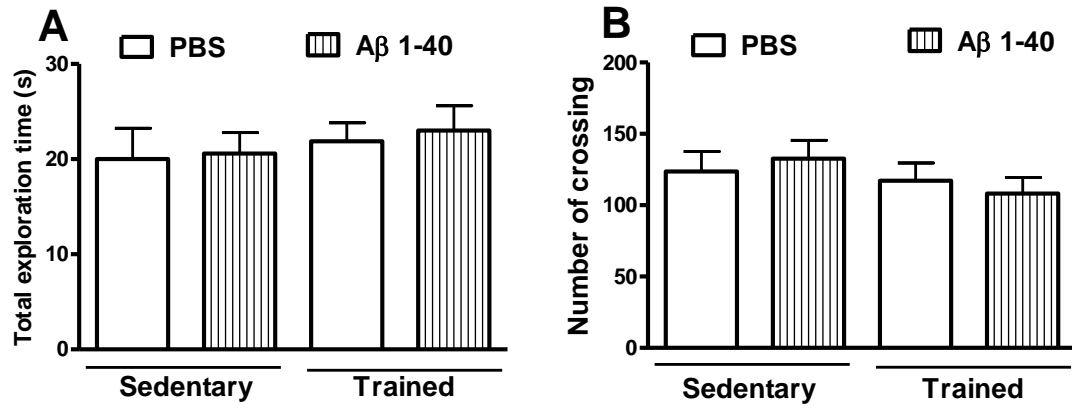


Fig. 3

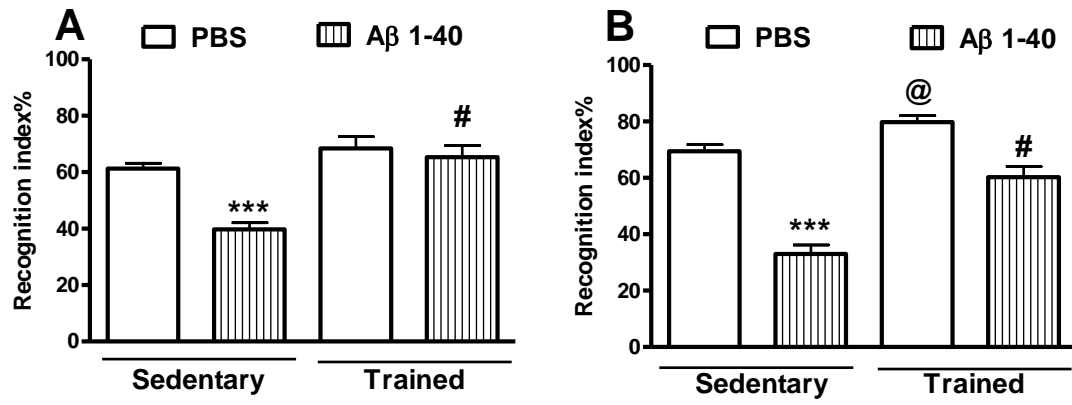


Fig. 4

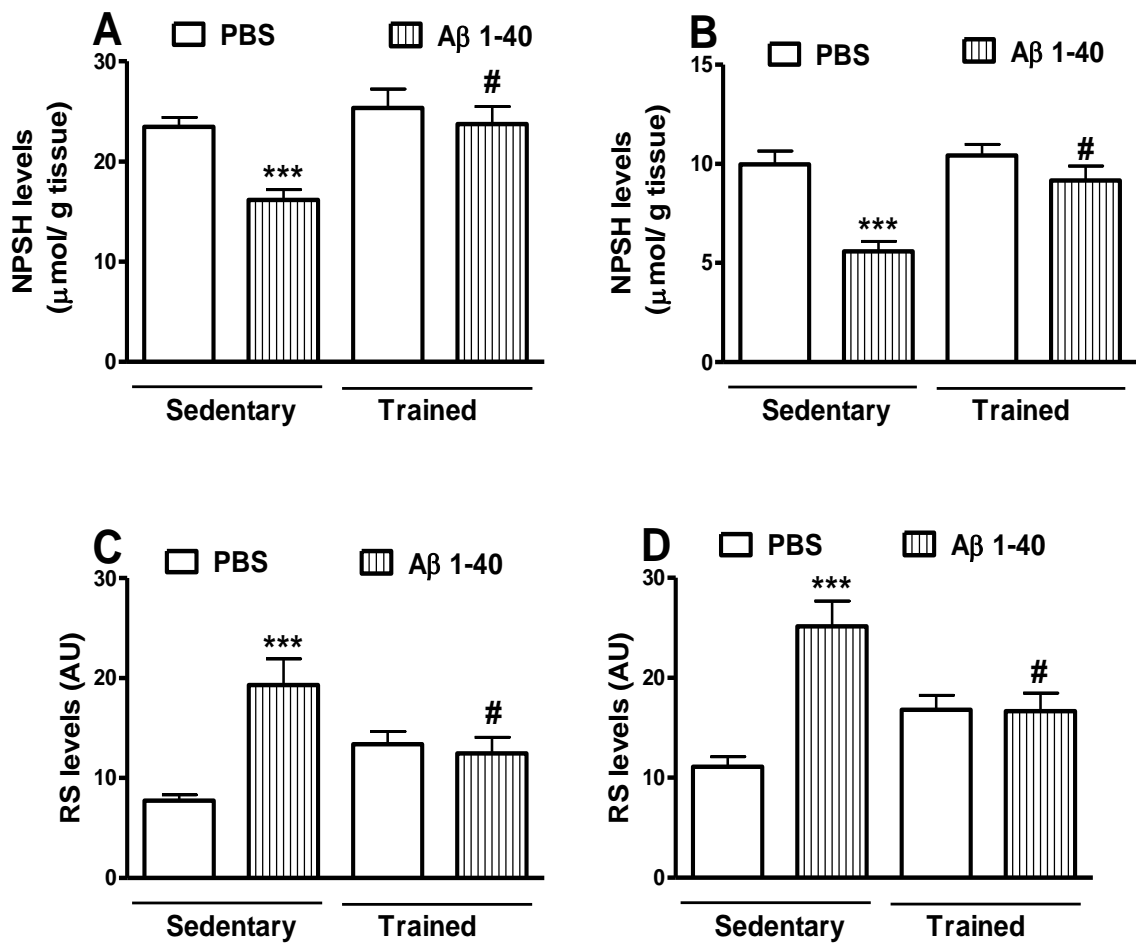


Fig. 5

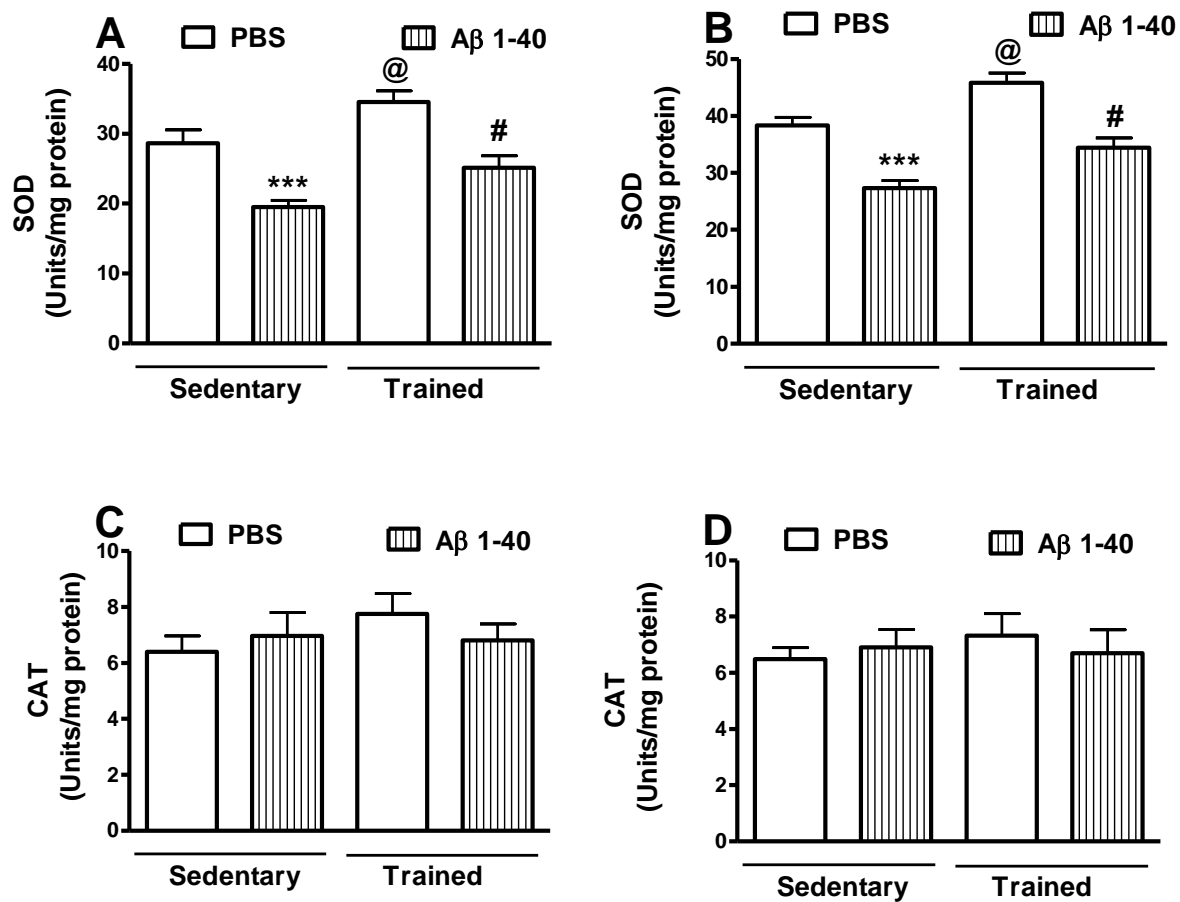


Fig. 6

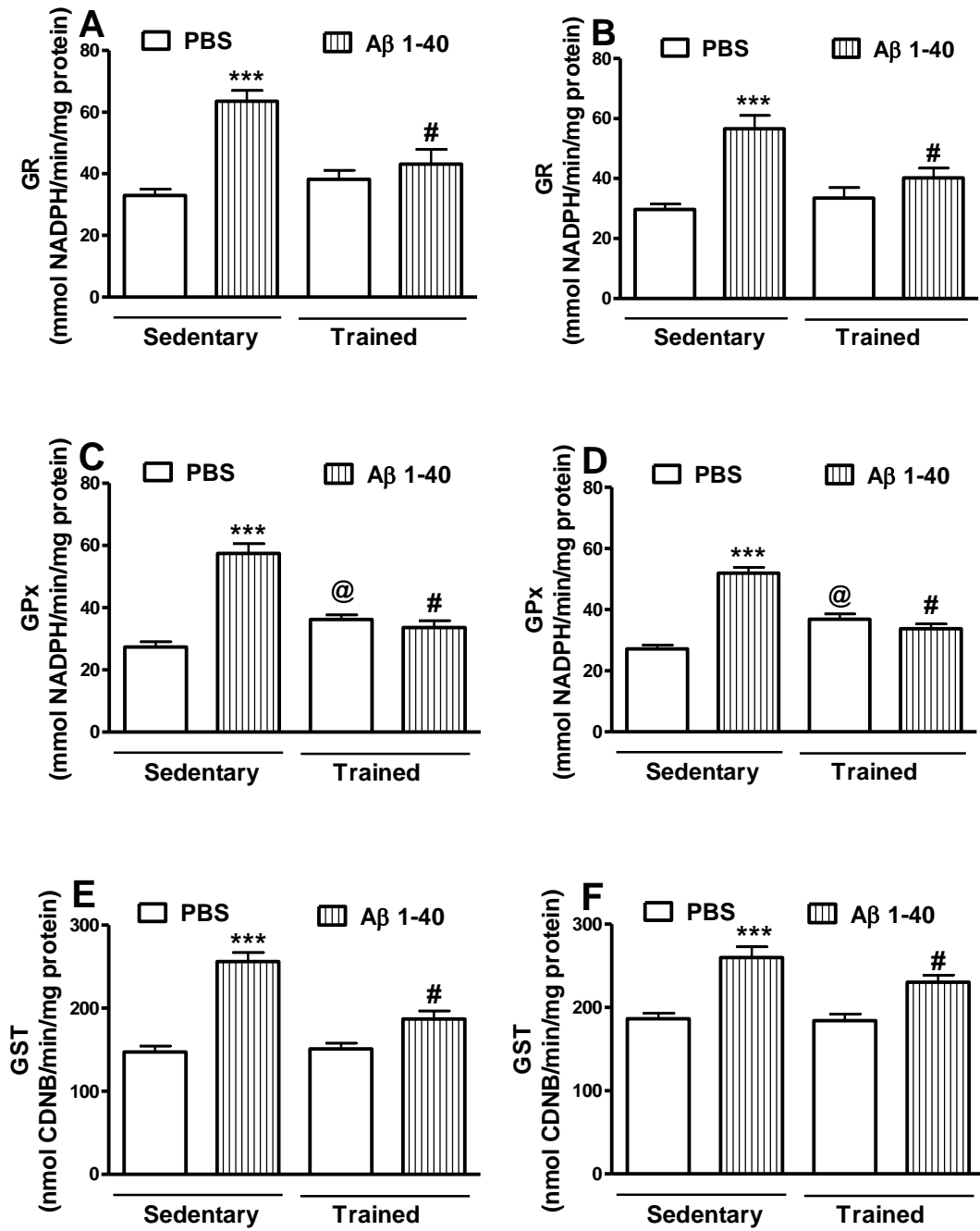


Fig. 7

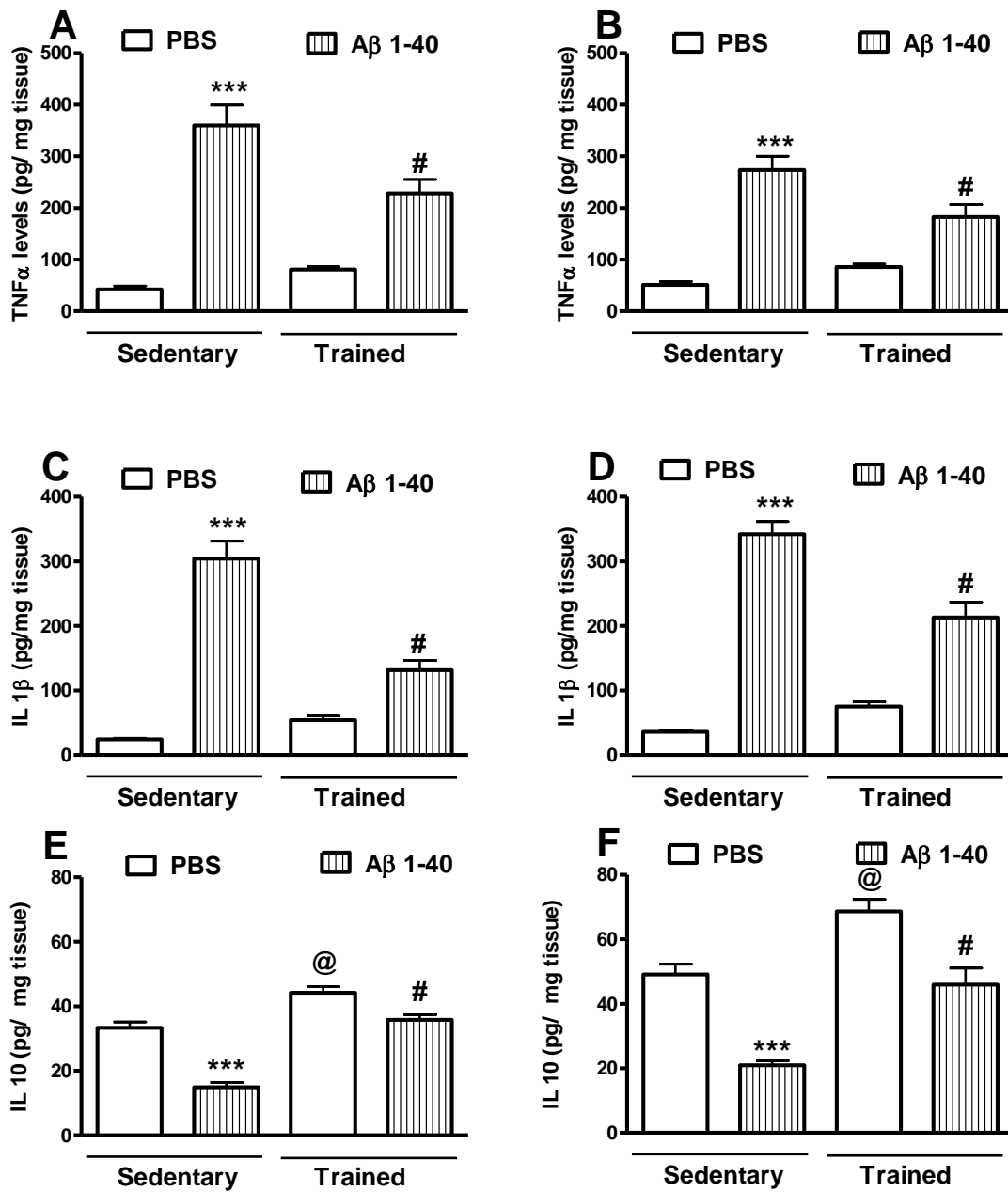


Fig. 8

Table 1. Eight-week swimming training protocol

	Intensity (%)	Training time (min/day)
1st week	0%* (water depth 5 cm)	20
2nd week	0% (water depth 20cm)	30
3rd week	1%	30
4th week	1%	40
5th week	2%	50
6th-8th week	3%	60

* Percent weight of BW attached to tail

PARTE III

DISCUSSÃO

A DA é uma doença crônico-degenerativa que acomete aproximadamente 26.6 milhões de pessoas em todo mundo (Lautenschlager et al., 2012). É uma patologia que provoca perda gradual da memória, das funções executivas e da estabilidade emocional (Ballard et al., 2011). Os avanços da medicina vêm proporcionando o aumento da expectativa de vida, no entanto, o risco de desenvolver DA aumenta substancialmente com o avanço da idade (Larson, 2008). Especula-se que em 2050 a doença atingirá 106.8 milhões de pessoas em todo o mundo (Lautenschlager et al., 2012). Portanto, o estudo de medidas protetivas ou de “agentes modificadores da doença” é sobremaneira importante.

Estudos reportam que a inatividade física está relacionada com o declínio cognitivo durante o envelhecimento e ao risco a demências, como a DA (Larson, 2008; Lautenschlager et al., 2008). Em contraste, a adoção de um estilo de vida fisicamente ativo traz importantes benefícios sobre a saúde em geral, mesmo quando é iniciado em idade avançada (Goto et al., 2007). O exercício físico regular é apontado como uma importante medida não-farmacológica e de relativo baixo custo econômico para a prevenção da DA. Entretanto, os mecanismos subjacentes ao efeito do exercício sobre características fenotípicas da DA ainda precisam ser mais bem elucidados. Com este propósito, modelos animais têm sido utilizados para o estudo do impacto do exercício sobre marcadores neurobiológicos da DA, devido à possibilidade do estudo *in vivo* do tecido cerebral.

Ante o exposto, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial efeito neuroprotetor do exercício de natação em um modelo de DA induzido pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos Swiss Albinos, investigando o comportamento cognitivo, bem como marcadores de estresse oxidativo e neuroinflamação no hipocampo e córtex pré-frontal.

No presente estudo, foi utilizado um protocolo de treinamento de natação de natureza aeróbia, com aumento progressivo da intensidade e duração, durante 8 semanas (adaptado de Huang et al., 2010). A intensidade do exercício foi incrementada pelo anexo de pesos na proximidade distal da cauda dos animais. Nós utilizamos pesos equivalentes a uma margem de 0-3% do peso corporal dos animais (figura 1). De acordo com estudos prévios, a intensidade relativa a esta margem é considerada abaixo do limiar de lactato para camundongos (Almeida et al., 2011), assim como é considerada eficaz para a melhoria da capacidade aeróbia de roedores (Gobatto et al., 2001). A natação foi escolhida em razão de não ter sido encontrado na literatura estudos sobre exercício e modelos de DA em camundongos com este tipo de atividade. Além disso, o nado é um comportamento natural de roedores, impondo menor estresse e solicitando o recrutamento de diferentes grupos musculares (Jolitha et al., 2006). De acordo com nossos resultados, a natação aumentou a atividade da CS e do complexo I da cadeia de transporte de elétrons no músculo quadríceps femoral dos camundongos treinados em comparação aos camundongos sedentários, confirmando a eficácia do protocolo de exercício empregado. Estas enzimas são importantes marcadores do metabolismo oxidativo muscular (Holloszy e Booth, 1976; McArdle et al., 2007).

A administração central do peptídeo sintético A β ₁₋₄₀ (análogo ao peptídeo encontrado nas placas amilóides de portadores de DA) em animais de laboratório vem mostrando ser um modelo bastante útil para o estudo da neurotoxicidade A β -induzida e intervenções neuroprotetoras (Takeda et al., 2009). Foi demonstrado que este modelo pode mimetizar vários sinais da DA, com resultados similares aos encontrados em camundongos transgênicos para DA (Prediger et al., 2007). Em nosso estudo, nós demonstramos que a infusão i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos Swiss Albinos causou prejuízos na memória, estresse oxidativo e neuroinflamação no hipocampo e córtex pré-frontal, corroborando e complementando estudos prévios, como os de Wang et al., (2001), Prediger et al., (2007), Medeiros et al., (2010), Passos et al., (2010), Piermartini et al., (2010), Gao et al. (2012) e Santos et al., (2012), que encontraram resultados similares.

A fim de analisar o comportamento cognitivo dos camundongos, nós utilizamos o teste de reconhecimento de objetos (ORT), o qual é um teste que

possui uma estreita analogia com testes de reconhecimento utilizados amplamente em humanos (Vedovelli et al., 2011). Squire (2009) cita que a memória é composta por 2 sistemas principais que possuem diferentes mecanismos operacionais e diferentes bases neuroanatômicas: o sistema de memória declarativa, definido como um sistema de memória consciente para fatos e eventos, cujo *locus* anatômico é o hipocampo e estruturas do lobo temporal medial, e o sistema de memória não-declarativa, um sistema de memória inconsciente para hábitos, controlado pelo corpo estriado e suas conexões. Neste sentido, o reconhecimento de objetos é um componente crítico da memória declarativa humana e que, ao contrário da memória não-declarativa (ou memória procedimental), requer uma fase de aquisição menos extensiva, podendo ser adquirida com menores exposições ao material a ser aprendido (Winters et al., 2008). Segundo Hopkins e Bucci (2010) o ORT é um teste apropriado para o estudo do efeito do exercício sobre a memória, e que não envolve elementos estressantes como choques e privação de alimento. Outrossim, a capacidade de reconhecimento de objetos é comumente acometida em humanos que sofrem de DA (Winters et al., 2008).

No presente estudo, tanto a memória de curto prazo (STM) quanto a memória de longo prazo (LTM) no ORT foram prejudicadas nos camundongos sedentários expostos ao peptídeo $A\beta_{1-40}$, revelado pela diminuição nos índices de reconhecimento neste teste. Este nosso resultado está de acordo com um estudo recente de Santos et al. (2012), em que foi demonstrado um significativo declínio na capacidade de reconhecimento de um novo objeto causado pela administração i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos. Por outro lado, o presente estudo demonstrou que o treinamento de natação preveniu o prejuízo cognitivo induzido pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$, preservando a STM e a LTM e mantendo os índices de reconhecimento do grupo exercício/ $A\beta_{1-40}$ próximos aos índices do grupo sedentário/PBS. Além disso, o treinamento de natação melhorou a LTM do grupo exercício/PBS em comparação ao grupo sedentário/PBS, indicando um efeito *per se* do exercício. Este efeito do treinamento de natação não foi encontrado na STM, indicando que tanto a LTM quanto a STM podem ser afetadas de maneiras diferentes pelo exercício.

Estes resultados estão em concordância com estudos que reportam que o exercício melhora a memória e previne o declínio cognitivo em humanos

(Kramer et al., 2006; Lautenschlager et al., 2008; Ballard et al., 2012). De fato, estudos demonstraram que o exercício pode melhorar a função cognitiva em ratos saudáveis (García-Capdevila et al., 2009; Hopkins e Bucci, 2011), em modelo de demência tipo-Alzheimer induzido por STZ em ratos (Jee et al., 2008; Rodrigues et al., 2010) e em camundongos transgênicos para DA (Yuede et al., 2009; Liu et al., 2011; Um et al., 2011). Tanto o estudo de Um et al. (2011) quanto o de Liu et al. (2011) mostraram que o treinamento em esteira melhorou a performance cognitiva no Water maze test em camundongos Tg-NSE/PS2m e Tg-APP/PS1, respectivamente. Utilizando o ORT, Yuede et al. (2009) demonstraram que camundongos melhoraram a performance cognitiva após 16 semanas de exercício voluntário em rodas de correr em comparação aos camundongos Tg2576 sedentários, com tempos de retenção de 24 e 72h. Portanto, nossos resultados complementam estes estudos, demonstrando que o treinamento de natação com intensidade abaixo do limiar de lactato pode preservar a função cognitiva – particularmente a capacidade de reconhecimento de objetos – em um modelo de DA em camundongos.

Há um crescente corpo de evidências demonstrando que o estresse oxidativo está implicado com a fisiopatologia da DA (Squier; 2001; Nunomura et al., 2006; Piermartini et al., 2010; Chauhan e Chauhan, 2006; Verri et al., 2012). É sugerido que os danos oxidativos estejam presentes tanto nos estágios finais, quanto iniciais da doença. No entanto, é possível que o estresse oxidativo estando presente precocemente no cérebro de pacientes com DA, seja o gatilho para a formação de placas amilóides e dos NFT (Nunomura et al., 2006). No presente estudo, nós demonstramos que 7 dias após uma dose única do peptídeo $A\beta_{1-40}$ ($3\mu\text{l/sítio}$; 400 pmol/animal ; rota i.c.v.) os níveis de RS estavam significativamente aumentados no hipocampo e córtex pré-frontal dos camundongos sedentários. Adicionalmente, nós demonstramos que a administração do peptídeo $A\beta_{1-40}$ causou um decréscimo nos níveis de NPSH no hipocampo e córtex pré-frontal dos camundongos sedentários. Estes resultados são similares a estudos anteriores que mostraram que a infusão i.c.v. deste peptídeo aumentou os níveis de RS no hipocampo (Santos et al., 2012) causou lipoperoxidação no hipocampo (Prediger et al., 2007; Piermartini et al., 2010; Santos et al., 2012), e reduziu os níveis de glutatona no hipocampo (Prediger et al., 2007) e córtex pré-frontal

(Prediger et al., 2007; Piermartini et al., 2010) de camundongos Swiss Albinos. Vários estudos reportaram que o peptídeo A β pode aumentar os níveis de RS (Mattson, 2004; Chauhan e Chauhan, 2006; Nunomura et al., 2006; Santos et al., 2012) e que este é um dos mecanismos da neurotoxicidade deste peptídeo (Prediger et al., 2007; Santos et al., 2012). O peptídeo A β pode, ainda, induzir peroxidação lipídica e causar disfunção mitocondrial. Ao ligar-se com metais redox-ativos como o Cu⁺ e o Fe⁺², pode danificar o retículo endoplasmático, causando uma desregulação no metabolismo do cálcio. Todos estes eventos levam ao aumento dos níveis de RS, que podem culminar em morte celular (Mattson, 2004). A glutathiona é o principal antioxidante tiól não-protéico em células de mamíferos, sendo considerado o principal tampão redox intracelular (Schafer and Buettner, 2001). A homeostase do estado redox cerebral é mantida principalmente pela função *scavenger* de radicais livres da glutathiona, sendo a primeira linha de defesa contra os RL O₂⁻ e OH^{*} produzidos nas células (Zhang et al., 2012b). Prediger et al. (2007) reportaram que o peptídeo A β pode causar severa depleção dos níveis de glutathiona, e que esta possui importante papel na neutralização da neurotoxicidade A β -induzida. Além disso, os mesmos autores citam que o peptídeo A β pode diminuir a síntese de glutathiona, e que isto está relacionado com o aumento da morte celular e com o aumento do acúmulo intracelular deste peptídeo. Recentemente, Ghosh et al. (2012) corroboraram nossos achados ao mostrarem que camundongos com transgenia tripla para DA (3xTg-DA) possuem níveis mais baixos de glutathiona em neurônios corticais e hipocampus do que camundongos não-transgênicos. De fato, foi sugerido que níveis elevados de RS e distúrbios na homeostase da glutathiona no cérebro podem ser os eventos precoces de estresse oxidativo induzidos pelo peptídeo A β , precedentes ao aparecimento das placas amilóides (Zhang et al., 2012b).

Em contrapartida, nós demonstramos que o treinamento de natação preveniu o aumento dos níveis de RS e a depleção dos níveis de NPSH no hipocampo e córtex pré-frontal induzidos pelo peptídeo A β ₁₋₄₀. Ademais, os níveis de NPSH do grupo exercício/A β ₁₋₄₀ foram mantidos próximos aos níveis de NPSH do grupo sedentário/PBS, em ambas as regiões cerebrais. Estes resultados são relevantes, pois demonstram que o treinamento de natação pode mitigar um mecanismo importante de alteração do estado redox celular

A β -induzido. Através destes resultados, nós também corroboramos estudos anteriores que reportaram que o exercício diminui os níveis de RS e lesões oxidativas e aumenta as defesas antioxidantes endógenas no cérebro de roedores (Ogonovszky et al., 2005; Radak et al., 2008). Similarmente aos nossos dados, García-Mesa et al. (2011) demonstraram que o exercício voluntário em rodas de correr diminuiu a peroxidação lipídica e aumentou os níveis de glutathione no córtex de camundongos 3x-Tg-DA. Yamamoto et al. (2002) reportaram que um dos mecanismos pelos quais o exercício físico crônico pode elevar os níveis de glutathione é através do aumento da atividade de enzimas do ciclo de regeneração redox da glutathione e do ciclo γ -glutamil, porém isto não foi demonstrado em tecidos cerebrais. Consecutivamente, pode-se inferir com base em nossos resultados e em estudos prévios, que o treinamento de natação ao atenuar a produção de RS e preservar os níveis de NPSH, pode interferir positivamente em um dos mecanismos implicados com a amiloidogênese.

No presente estudo, o estresse oxidativo no hipocampo e córtex pré-frontal também foi caracterizado por alterações em enzimas antioxidantes. Os camundongos sedentários expostos ao peptídeo A β ₁₋₄₀ tiveram uma inibição da atividade da SOD. Este resultado está de acordo com o estudo de Bagheri et al. (2011), que recentemente mostraram que a injeção intra-hipocampal do peptídeo A β ₁₋₄₀ causou uma redução na atividade da SOD no hipocampo de ratos. Interessantemente, Schuessel et al. (2005) demonstraram que camundongos transgênicos Thy1-APP751_{SL} (que superexpressam a molécula APP e exibem altos níveis de placas amilóides) apresentaram uma clivagem amiloidogênica da APP aumentada simultaneamente com a redução da atividade da Cu-Zn-SOD; resultado este que não foi verificado nos camundongos transgênicos PDGF-APP695_{SDL} (que apresentam baixa produção de placas amilóides). Este resultado indica que a inibição da Cu-Zn-SOD pode ser um importante mecanismo oxidativo do peptídeo A β ₁₋₄₀. Reforçando este achado, um estudo *in vitro* recente mostrou que pode haver uma inibição direta da atividade da Cu-Zn-SOD pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ (Oyatsi and Whiteley 2012).

Em nosso estudo, não foram encontradas alterações significativas na atividade da CAT. Isto pode ser em parte explicado pelos baixos níveis desta

enzima naturalmente encontrados no cérebro (Aksu et al. 2009), ou ainda em razão da maior afinidade da GPx ao H_2O_2 em baixas concentrações ($K_m = 1\mu M$) em comparação à CAT ($K_m = 1 Mm$) (Sies, 1986). Em contraste, nós encontramos que as atividades das enzimas GPx, GR e GST estavam aumentadas no hipocampo e córtex pré-frontal do grupo sedentário/ $A\beta_{1-40}$ em comparação com o grupo sedentário/PBS. Este resultado foi confirmado por Prediger et al. (2007), os quais demonstraram um aumento da atividade das enzimas GPx e GR no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos Swiss Albinos após 7 dias da administração do peptídeo $A\beta_{1-40}$. Ao encontro destes resultados, Jhoo et al. (2004) também mostraram um aumento da atividade destas enzimas no hipocampo e córtex cerebral após insulto pró-oxidante induzido por $A\beta_{1-42}$ em camundongos. Prediger et al. (2007) explicam que o sistema da glutathiona pode ser ativado em resposta ao estresse oxidativo no cérebro de pacientes com DA, assim como em roedores tratados com $A\beta$. Assim sendo, os níveis diminuídos de NPSH encontrados no nosso estudo também podem ser explicados pelo aumento da atividade da GPx levando ao consumo da glutathiona reduzida. O aumento da atividade da GR, por sua vez, reflete a redução da GSSG à GSH, contribuindo para proteção e reparo de tíois protéicos celulares (Jhoo et al., 2004; Prediger et al., 2007).

Portanto, o aumento na atividade das enzimas GPx e GR – ocorrendo em paralelo ao aumento da produção de RS nas mesmas regiões cerebrais – pode ter ocorrido como uma reposta de neutralização aos danos oxidativos $A\beta$ -induzidos (Jhoo et al., 2004; Prediger et al., 2007). Adicionalmente, nós sugerimos que o aumento da atividade destas enzimas pode ter ocorrido devido à inibição da atividade da SOD. Com a diminuição desta enzima há uma menor detoxificação do radical ânion superóxido. Este radical livre pode catalisar a redução das formas livres do ferro e do cobre que, por suas vezes, podem aumentar a produção do radical hidroxil através das reações de Fenton e Haber-Weiss, perpetuando os eventos cíclicos de estresse oxidativo.

A GST é uma enzima que desempenha um papel importante na eliminação do 4-hidroxinonenal (HNE) através da conjugação com a glutathiona, sendo o principal mecanismo detoxificador deste aldeído (Balogh e Atkins, 2011). O HNE, um produto da peroxidação lipídica, através de sua natureza eletrofílica pode formar adutos covalentes com proteínas, ácidos graxos e com

o DNA (Völkel et al., 2006). Com sua neurotoxicidade demonstrada *in vitro* e *in vivo*, seus níveis são encontrados elevados no cérebro de portadores de DA (Lovell e Markesbery, 1996). Conseqüentemente, o aumento da atividade da GST no hipocampo e córtex pré-frontal encontrado em nosso estudo, pode ter ocorrido como um mecanismo de neutralização do aumento da peroxidação lipídica induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀.

Por outro lado, o presente estudo demonstrou que o treinamento de natação por 8 semanas preveniu a inibição da atividade da SOD e o aumento da atividade das enzimas GPx, GR e GST no hipocampo e córtex pré-frontal induzidos pelo peptídeo A β ₁₋₄₀. Nós também demonstramos que o treinamento de natação, *per se*, aumentou a atividade da SOD nestas estruturas cerebrais no grupo exercício/PBS em comparação com o grupo sedentário/PBS. Em acordo com nosso estudo, Um et al. (2011) demonstraram que o treinamento de corrida em esteira por 3 meses aumentou a expressão da SOD1 e SOD2 no hipocampo de camundongos Tg-NSE/PS2m. Nosso estudo também corrobora a sustentação de que o exercício é capaz de aumentar a atividade da SOD no hipocampo e córtex cerebral de ratos saudáveis (Radak et al., 2012; Devi e Kiran, 2004). À luz de nossos resultados, nós sugerimos que o exercício ao preservar os níveis de NPSH e aumentar a atividade da SOD, atuou na prevenção do aumento dos níveis de RS e do aumento das atividades da GPx, GR e GST induzidos pelo peptídeo A β ₁₋₄₀. Deste modo, nós demonstramos que o exercício pode atuar prevenindo um importante mecanismo fisiopatológico da DA.

Existem crescentes evidências relacionando a neuroinflamação à neuropatologia da DA (Streit et al., 2004; Frank-Cannon et al., 2009; Pervaiz e Hoffman-Goetz, 2011; Woods et al., 2012). Foi demonstrado que os agregados A β podem ativar as micróglia, as quais liberam várias moléculas neurotóxicas, incluindo RS e citocinas, como a IL-1 β e o TNF- α (Streit et al., 2004). Estas citocinas são encontradas em níveis elevados no cérebro de pacientes com DA e em modelos animais da doença (Pervaiz e Hoffman-Goetz, 2011). Sendo uma característica de doenças neurodegenerativas, a ativação microglial e a subsequente liberação crônica de citocinas inflamatórias levam à disfunção e morte neuronal, favorecendo a deposição amilóide e contribuindo para a aceleração e progressão da DA (Frank-Cannon et al., 2009).

Suportando estes dados, nós demonstramos que 7 dias após a administração do peptídeo A β ₁₋₄₀, houve um aumento substancial dos níveis de IL-1 β e TNF- α no hipocampo e córtex pré-frontal dos camundongos sedentários. Similarmente aos nossos resultados, Alkam et al. (2008) demonstraram que a infusão i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ elevou a expressão de TNF- α no hipocampo de camundongos C57/BL6, simultaneamente a um prejuízo na performance no ORT. Estes resultados foram revertidos com a administração de talidomida, confirmando o papel do TNF- α no déficit cognitivo A β ₁₋₄₀-induzido. Em contraste, nós mostramos que o treinamento de natação empregado em nosso estudo foi capaz de mitigar a elevação dos níveis de IL-1 β e TNF- α no hipocampo e córtex pré-frontal dos camundongos expostos ao peptídeo A β ₁₋₄₀. Este resultado demonstra que o treinamento de natação pode prevenir o efeito pró-inflamatório deste peptídeo, reforçando estudos que sustentam o efeito anti-inflamatório do exercício (Gleesom et al., 2011; Stranaham et al., 2012).

Nossos resultados também corroboram estudos prévios em que o exercício crônico atenuou a neuroinflamação no hipocampo de camundongos transgênicos para DA e tauopatias (Parachikova et al., 2008; Leem et al., 2011). No estudo de Leem et al. (2011) foi verificado que camundongos NSE/htau23 (com um gene humano mutante da proteína tau) possuíam maior expressão de IL-1 β e TNF- α no hipocampo em comparação com os camundongos não-transgênicos. Após 12 semanas de treinamento de corrida em esteira com baixa intensidade (velocidade de 12m/min., sem inclinação) e longa duração (até 60 min.) os níveis de IL-1 β e TNF- α foram reduzidos no hipocampo dos camundongos NSE/htau23. Paralelamente, o treinamento de corrida em esteira causou uma infra-regulação de outros marcadores inflamatórios, como a COX-2 e a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), assim como de moléculas sinalizadoras, e.g. p-ERK e p-p38, no hipocampo dos camundongos transgênicos.

Um dos principais mecanismos imunoregulatórios do exercício é o aumento da produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias, induzidos pela contração muscular (Gleesom et al., 2011). A esse respeito, é bem estabelecido o papel da IL-10 como supressora da produção de TNF- α e IL-1 β (Gleesom et al., 2011). Neste sentido, o aumento dos níveis periféricos e

centrais da IL-10 tem sido reportado como um importante mediador biológico induzido pelo exercício (Pervaiz e Hoffman-Goetz, 2011; Foster et al., 2011). Foi reportado que a IL-10 pode diminuir os sintomas da DA (Strle et al., 2001) e pode suprimir a produção de citocinas inflamatórias pelas micróglias induzida pelo peptídeo $A\beta_{1-42}$ (Szczepanik et al. 2001). No vigente estudo, nós encontramos que o treinamento de natação preveniu a redução dos níveis de IL-10 no hipocampo e córtex pré-frontal dos camundongos tratados com $A\beta_{1-40}$, preservando os níveis desta citocina no grupo exercício/ $A\beta_{1-40}$ aos níveis do grupo sedentário/PBS. Ademais, no presente estudo nós verificamos que o treinamento de natação elevou expressivamente os níveis de IL-10 nestas regiões cerebrais no grupo exercício/PBS em comparação com o grupo sedentário/PBS.

Considerados em conjunto, nossos resultados demonstram claramente que o treinamento de natação é um tipo de exercício capaz de modular a resposta de citocinas pró-inflamatórias no cérebro de camundongos tratados com peptídeo $A\beta_{1-40}$, corroborando o seu papel bloqueador dos níveis de IL-1 β e TNF- α . Apesar da existência de outros mecanismos, nós indicamos que essa resposta exercício-induzida foi mediada pela IL-10. Além disso, ao regular o balanço entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, o treinamento de natação pode ter reduzido os níveis de RS através de um mecanismo antioxidante indireto. Portanto, esta propriedade antiinflamatória do exercício pode representar um mecanismo adicional de proteção contra a neurotoxicidade induzida pelo peptídeo $A\beta_{1-40}$.

Em resumo, o presente estudo confirmou a hipótese de que o exercício é capaz de proteger contra alguns mecanismos neurotóxicos do peptídeo $A\beta_{1-40}$, agindo como um agente neuroprotetor. Nossos resultados demonstraram que o treinamento de natação por 8 semanas com intensidade leve foi efetivo em prevenir o prejuízo cognitivo $A\beta_{1-40}$ -induzido. Este foi o primeiro estudo a mostrar o efeito do exercício em um modelo de DA induzido pela infusão i.c.v. do peptídeo $A\beta_{1-40}$ em camundongos. Há uma escassez de estudos investigando o papel do treinamento de natação sobre modelos de DA, assim como poucos estudos se ativeram a investigar a interação exercício x performance de reconhecimento de objetos nestes modelos. Desta forma, com base em nossos resultados, nós demonstramos que os camundongos tratados

com $A\beta_{1-40}$ e que foram submetidos ao treinamento de natação tiveram esta capacidade cognitiva preservada em comparação aos camundongos sedentários tratados com $A\beta_{1-40}$. Nós também demonstramos que o treinamento de natação protegeu o hipocampo e o córtex pré-frontal dos camundongos contra o estresse oxidativo e a neuroinflamação causados pela administração central do peptídeo $A\beta_{1-40}$. Nós indicamos que estes resultados são conseqüentes, principalmente, pelo efeito supra-regulatório do treinamento de natação sobre a atividade da SOD e sobre os níveis de IL-10, protegendo a homeostase da glutathione. Estes mecanismos podem ser explicados, em parte, pela ativação de vias de sinalização redox-sensíveis exercício-induzida, em acordo com princípios horméticos.

Finalmente, tendo em vista as características do nosso modelo de estudo e com base em dados de outros laboratórios, nós indicamos que o exercício físico pode ser uma intervenção neuroprotetora bastante efetiva em estágios iniciais da doença, e que a adoção de um estilo de vida fisicamente ativo, principalmente como medida profilática, pode amortizar a progressão à DA em humanos.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o treinamento de natação por 8 semanas com baixa intensidade foi efetivo em atenuar os seguintes danos provocados pela infusão i.c.v. do peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos Swiss Albinos:

- Prejuízos nas memórias de curto e longo prazo no teste de reconhecimento de objetos.
- Aumento dos níveis de RS e diminuição dos níveis de NPSH no hipocampo e córtex pré-frontal.
- Inibição da atividade da SOD e aumento da atividade da GPx, GR e GST no hipocampo e córtex pré-frontal.
- Aumento dos níveis de IL-1 β e TNF- α e diminuição dos níveis de IL-10 no hipocampo e córtex pré-frontal.

Em conclusão, nós sugerimos que o exercício aeróbio regular pode prevenir o declínio cognitivo, o estresse oxidativo e a neuroinflamação induzida pelo peptídeo A β ₁₋₄₀ em camundongos, suportando a hipótese de que o exercício pode ser utilizado como uma medida não-farmacológica para reduzir os sinais e sintomas da DA.

REFERÊNCIAS

Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. **J Neurosci** 2005; **25:4217-4221**.

Alkam T, Nitta A, Mizoguchi H, Saito K, Seshima M, Itoh A, Yamada K, Nabeshima T. Restraining tumor necrosis factor-alpha by thalidomide prevents the amyloid beta-induced impairment of recognition memory in mice. **Behav Brain Res** 2008; **189:100-106**.

Almeida WS, Lima LC, Cunha VN, Cunha RR, Araújo RC, Barros CC, Simões HG, Campbell CS. Assessment of aerobic capacity during swimming exercise in ob/ob mice. **Cell Biochem Funct** 2011; **29:666-672**.

Aksu I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O. Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. **Neurosci Lett** 2009; **452:281-285**.

Austin BP, Nair VA, Meier TB, Xu G, Rowley HA, Carlsson CM, Johnson SC, Prabhakaran V. Effects of hypoperfusion in Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis** 2011; **3:123-133**.

Bagheri M, Joghataei MT, Mohseni S, Roghani M. Genistein ameliorates learning and memory deficits in amyloid $\beta_{(1-40)}$ rat model of alzheimer's disease. **J Neuroimmunol 2011; 113:49-62.**

Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E. Alzheimer's disease. **Lancet 2011; 377:1019-1031.**

Balogh LM, Atkins WM. Interactions of glutathione transferases with 4-hydroxynonenal. **Drug Metab 2011; 43:165-178.**

Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. **Mol Cell Biochem 2003; 253:307-312.**

Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, Marcus DS, Cairns NJ, Xie X, Blazey TM, Holtzman DM, Santacruz A, Buckles V, Oliver A, Moulder K, Aisen PS, Ghetti B, Klunk WE, McDade E, Martins RN, Masters CL, Mayeux R, Ringman JM, Rossor MN, Schofield PR, Sperling RA, Salloway S, Morris JC. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited alzheimer's disease. **N Engl J Med 2012; 367:795-804.**

Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Laurent C, Lestavel S, Figeac M, Sultan A, Troquier L, Leboucher A, Caillierez R, Grosjean ME, Demeyer D, Obriot H, Brion I, Barbot B, Galas MC, Staels B, Humez S, Sergeant N, Schraen-Maschke S, Muhr-Tailleux A, Hamdane M, Buee L, Blum D.

Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. **Neurobiol Dis** 2011; **43:486-494**.

Bertchold NC, Chinn G, Chou M, Kesslak JP, Cotman CW. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. **Neurosci** 2005; **133:853-861**.

Berchtold NC, Castello N, and Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. **Neuroscience** 2010; **167:588-597**.

Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stress: A review. **Can J Appl Physiol** 2004; **29:245-263**.

Cassilhas RC, Lee KS, Fernandes J, Oliveira MG, Tufik S, Meeusen R, de Mello MT. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. **Neuroscience** 2012; **202:309-317**.

Cechetti F, Worm PV, Elsner VR, Bertoldi K, Sanches E, Bem J, Siqueira IR, Netto CA. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Neurobiol Learn Mem** 2012; **97:90-96**.

Chauhan V, Chauhan A. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Pathophysiology** 2006; **13:195-208**.

Coelho FG, Gobbi S, Andreatto CA, Corazza DI, Pedroso RV, Santos-Galduróz RF. Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): A systematic review of experimental studies in the elderly. **Arch Gerontol Geriatr** 2012; **56:10-5**.

Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochem Soc Trans** 2002; **30:280-285**.

Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci** 2002; **25:295-301**.

Cotman CW, Berchtold NC, Adlard PA, Perreau VM. Exercise and the brain. **Mol cell exerc Physiol** 2005; **331-341**.

Devi SA, Kiran TR. Regional responses in antioxidant system to exercise training and dietary Vitamin E in aging rat brain. **Neurobiol Aging** 2004; **25:501-508**.

Dickson, DW. Apoptotic mechanisms in Alzheimer neurofibrillary degeneration: cause or effect? **J Clin Invest** 2004; **114:23-27**.

El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid fibrils. **Nature** 1996; **382:716-719**.

Foster PP, Rosenblatt KP, Kuljiš RO. Exercise-Induced Cognitive Plasticity, Implications for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's. **Disease Front Neurol** 2011; 2:28.

Frank-Cannon TC, Alto LT, McAlpine FE, Tansey MG. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? **Mol Neurodegener** 2009; 16:4:47

Gao Y, Li C, Yin J, Shen J, Wang H, Wu Y, Jin H. Fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown algae, improves cognitive impairment induced by infusion of A β peptide in rats. **Environ Toxicol Pharmacol** 2012; 33:304-311.

García-Capdevila S, Portell-Cortés I, Torras-Garcia M, Coll-Andreu M, Costa-Miserachs D. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. **Behav Brain Res** 2009; 202:162-170.

García-Mesa Y, López-Ramos JC, Giménez-Llort L, Revilla S, Guerra R, Gruart A, LaFerla FM, Cristòfol R, Delgado-García JM, Sanfeliu C. Physical exercise protects against alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. **J Alzheimer Dis** 2011; 24:421-454.

Ghosh D, LeVault KR, Barnett AJ, Brewer GJ. A reversible early oxidized redox state that precedes macromolecular ROS damage in aging nontransgenic and 3xTg-AD mouse neurons. **J Neurosci** 2012; 17:5821-5832.

Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nat Rev Immunol** 2011; **11:607-615**.

Gobatto CA, De Mello MA, Sibuya CY, De Azevedo JR, Dos Santos LA, Kokubun E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol** 2001; **130:21-27**.

Goto S, Naito H, Kaneko T, Chung HY, Radák Z. Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress. **Appl Physiol Nutr Metab** 2007; **32:948-953**.

Haass C, De Strooper B. The presenilins in Alzheimer's disease: proteolysis holds the key. **Science** 1999; **286:916-919**.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ Health Perspect** 1994; **102:5-12**.

Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 3rd ed. New York: Oxford, 1999.

Holloszy JO, Booth FW. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. **Annu Rev Physiol** 1976; **38:273-291**.

Hopkins ME, Bucci DJ. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-Induced improvement in object recognition memory. **Neurobiol Learn Mem 2010; 94:278-284.**

Huang TH, Hsieh SS, Liu SH, Chang FL, Lin SC, Yang RS. Swimming training increases the post-yield energy of bone in young male rats. **Calcif Tissue Int 2010; 86: 142-153.**

Huang HC, Jiang ZF. Accumulated Amyloid- β Peptide and Hyperphosphorylated Tau Protein: Relationship and Links in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis 2009; 16:15–27.**

Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. **Exp Biol Med 1999; 222:283-292.**

Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Exercise and hormesis activation of cellular antioxidant signaling pathway. **Ann NY Acad Sci 2006; 1067:425-435.**

Jolitha AB, Subramanyam MVV, Asha Devi S. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. **Exp Gerontol 2006; 41:753-763.**

Kramer AF, Erickson KI, Colcombe SJ. Exercise, cognition and aging brain. **J Appl Physiol 2006; 101:1237-1242.**

LaFerla FM. Amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat Ver Neurosci* 2008.
Disponível em: http://www.nature.com/nrn/posters/ad/nrn_ad_posters.pdf

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease.
***Nat Rev Neurosci* 2007; 8:499-509.**

Jee YS, Ko IG, Sung YH, Lee JW, Kim YS, Kim SE, Kim BK, Seo JH, Shin MS, Lee HH, Cho HJ, Kim CJ. Effects of treadmill exercise on memory and c-Fos expression in the hippocampus of the rats with intracerebroventricular injection of streptozotocin. ***Neurosci Lett* 2008; 443:188-192.**

Jhoo JH, Kim HC, Nabeshima T, Yamada K, Shin EJ, Jhoo WK, Kim W, Kang KS, Jo SA, Woo JI. Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. ***Behav Brain Res* 2004; 155:185-196.**

Johnson RA, Mitchell GS. Exercise-induced changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: effects of rat strain. ***Brain Res* 2003; 983:108-114.**

Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. ***Toxicology* 2011; 283:65-87.**

Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. ***Mol Cell Biochem* 2010; 345:91-104.**

Larson, EB. Physical activity for older adults at risk for alzheimer disease. **JAMA 2008; 300:1077-1079.**

Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. **Eur J Neurosci 2011; 33:1264-1274.**

Lautenschlager NT, Cox K, Cyarto EV. The influence of exercise on brain aging and dementia. **Biochim Biophys Acta 2012; 1822:474-481.**

Lautenschlager NT, Cox KL, Flicker L, et al. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. **JAMA. 2008; 300:1027-1037.**

Leem YH, Lee YL, Son HJ, Lee SH. Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23. **Biochem Biophys Res Commun 2011; 406:359-365.**

Lessmann V, Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. **Neurosci Res 2009; 65:11-22.**

Lista I, Sorrentino G. Biological mechanisms of physical activity in pre-venting cognitive decline. **Cell Mol Neurobiol 2009; 30:493-503.**

Liu HL, Zhao G, Cai K, Zhao HH, Shi LD. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. **Behav Brain Res** 2011; **218:308-314**.

Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. Decreased glutathione transferase activity in brain and ventricular fluid in Alzheimer's disease. **Neurology** 1998; **51:1562-1566**.

Marosi K, Bori Z, Hart N, Sárga L, Koltai E, Radák Z, Nyakas C. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. **Neuroscience** 2012; **226:21-28**.

Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. **J Sports Med Phys Fitness** 1997; **37:235-239**.

Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature** 2004; **430:631-639**.

McArdle WD, Katch FL, Katch VL. **Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

Medeiros R, Figueiredo CP, Pandolfo P, Duarte FS, Prediger RDS, Passos GF, Calixto JB. The role of TNF- α signaling pathway on COX-2 upregulation and

cognitive decline induced by β -amyloid peptide. **Behav Brain Res 2010; 209:165-173.**

Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **Eur J Neurosci 2002; 16:1107-1116.**

Mota BC, Pereira L, Souza MA, Silva LFA, Magni DV, Ferreira APO, Oliveira MS, Furian AF, Mazzardo-Martins L, Da Silva MD, Santos ARS, Ferreira J, Figuera MR, Royes LFF. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical Approach. **Neurotox Res 2010; 21:175-184.**

Neeper SA, Gomez-Pinilla F, Cotman C. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res 1996; 726:49-56.**

Nichol KE, Poon WW, Parachikova AI, Cribbs DH, Glabe CG, Cotman CW. Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. **J Neuroinflammation. 2008; 5:13.**

Nunomura A, Castellani RJ, Xiongwei Z, Moreira PI, Perry G, Smith MA. Involvement of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. **J Neuropathol Exp Neurol 2006; 65:631-641.**

Ogonovszky H, Sasvári M, Dosek A, Berkes I, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Goto S, Radák Z. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. **Can J Appl Physiol.** 2005; **30:186-195.**

Oyatsi F, Whiteley CG. Interaction of superoxide dismutase with the glycine zipper regions of β -amyloid peptides: Is there an implication towards alzheimer's disease and oxidative stress? **J Enzyme Inhib Med Chem** 2012; doi: **10.3109/14756366.2012.680063.**

Parachikova A, Nichol KE, Cotman CW. Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. **Neurobiol Dis** 2008; **30:121-129.**

Passos GF, Figueiredo CP, Prediger RDS, Silva KABS, Siqueira JM, Duarte FS, Leal PC, Medeiros R, Calixto JB. Involvement of phosphoinositide 3-kinase c in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by β -amyloid 1–40 peptide in mice. **Brain Behav Immun** 2010; **24:493-501.**

Pervaiz N, Hoffman-Goetz, N. Freewheel training alters mouse hippocampal Cytokines. **Int J Sports Med** 2011; **32:889-895.**

Petersen AMW, Pedersen, BK. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol** 2005; **98:1154-1162.**

Piermartiri TCB, Figueiredo CP, Rial D, Duarte FS, Bezerra SC, Mancini G, De Bem AF, Prediger RDS, Tasca CI. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid- β_{1-40} administration in mice: Evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Exp neurol** 2010; **226:274-284**.

Poo M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nature Rev Neurosci**. 2001; **2:24-32**.

Prediger RDS, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, Figueiredo, CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL. Differential susceptibility following β -amyloid peptide-(1–40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav Brain Res** 2007; **177:205-213**.

Querfurth HW, LaFerla, FM. Alzheimer's disease. **N Engl J Med** 2010; **362:329-344**.

Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med** 2008; **44:153-159**.

Radak Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I. Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis** 2010; **20:777-783**.

Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. **Exerc Immunol Rev** 2001; 7:90-107.

Rodrigues L, Dutra MF, Ilha J, Biasibetti R, Quincozes-Santos A, Leite MC, Marcuzzo S, Achaval M, Gonçalves CA. Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. **J Neural Transm** 2010; 11:1295-1305.

Santos DB, Peres KC, Ribeiro RP, Colle D, dos Santos AA, Moreira EL, Souza DO, Figueiredo CP, Farina M. Probucol, a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. **Exp Neurol** 2012; 233:767-775.

Schafer FQ, Buettner, GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic Biol Med** 2001; 30:1191-1212.

Schuessel K, Schäfer S, Bayer TA, Czech C, Pradier L, Müller-Spahn F, Müller WE, Eckert A. Impaired Cu/Zn-SOD activity contributes to increased oxidative damage in APP transgenic mice. **Neurobiol Dis** 2005; 18:89-99.

Soumare A., Tavernier B, Alperovitch A, Tzourio C, Elbaz A. A cross-sectional and longitudinal study of the relationship between walking speed and cognitive

function in community-dwelling elderly people. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 2009; 64:1058-1065.

Souza MA, Oliveira MS, Furian AFF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Corte LCD, Silva LFA, Retamoso LT, Corte CLD, Puntel GO, Avila DS, Soares FAA, Figuera MR, Mello CF, Royes LFFR. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia** 2009; 50:811-823.

Sies H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew Chem Int Ed Engl** 1986; 25:1058-1071.

Schneider CD, Barp J, Ribeiro JL, Belló-Klein A, Oliveira AR. Oxidative stress after three different intensities of running. **Can J Appl Physiol.** 2005; 30:723-734.

Somani SM, Husain K, Diaz-Phillips L, Lanzotti DJ, Kareti KR, Trammell GL. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. **Alcohol** 1996; 13:603-610.

Squier TC. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. **Exp Neurol** 2001; 36:1539-1550.

Squire LR. Memory and brain systems: 1969-2009. **J Neurosci** 2009; 29:12711-12716.

Stranaham AM, Martin B, Maudsley S. Anti-inflammatory effects of physical activity in relationship to improved cognitive status in humans and mouse models of alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res 2012; 9:86-92.**

Stranahan AM, Mattson MP. Metabolic Reserve as a Determinant of Cognitive Aging. **J Alzheimers Dis 2012; 30:5-13.**

Stranaham AM, Zhou W, Martin B, Maudsley S. Pharmacomimetics of exercise: novel approaches for hippocampally-targeted neuroprotective agents. **Curr Med Chem 2009; 16: 4668.**

Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. Interleukin-10 in the brain. **Crit Rev Immunol 2001; 21:427-429.**

Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. **J Neuroinflammation. 2004; 1:14**

Szczepanik AM, Funes S, Petko W, Ringheim GE. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta (1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. **Crit Rev Immunol 2001; 21:427-449.**

Takeda S, Sato N, Niisato K, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Rakugi H, Kano M, Morishita R. Validation of Abeta1–40 administration into mouse

cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease. **Brain Res 2009; 1280:137-147.**

Tarawneh R, Holtzman DM. Biomarkers in translational research of Alzheimer's Disease. **Neuropharmacology 2010; 59:310-322.**

Ter-Minassian A. Cerebral metabolism and brain injury. **Ann Fr Anesth Reanim 2006; 7:714-721.**

Tuppo EE, Arias HR. The role of inflammation in Alzheimer's disease. **Int J Biochem Cell Biol 2005; 37:289-305.**

Um HS, Kang EB, Koo JH, Kim HT, Lee J, Kim EJ, Yang CH, An GY, Cho IH, Cho JY. Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of alzheimer's disease. **Neurosci Res 2011; 69:161-173.**

Vedovelli K, Silveira E, Velho E, Stertz L, Kapczinski F, Schröder N, Bromberg E. Effects of increased opportunity for physical exercise and learning experiences on recognition memory and brain-derived neurotrophic factor levels in brain and serum of rats. **Neuroscience 2011; 199:284-291.**

Verri M, Pastoris O, Dossena M, Aquilani R, Guerriero F, Cuzzoni G, Venturini L, Ricevuti G, Bongiorno AI. Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Int J Immunopathol Pharmacol 2012; 25:345-353.**

Vidoni ED, Honea RA, Billinger SA, Swerdlow RH, Burns JM. Cardiorespiratory fitness is associated with atrophy in alzheimer's and aging over 2 years. **Neurobiol Aging 2011; 33:1624-1632.**

Vivar C, Potter MC, van Praag H. All About Running: Synaptic Plasticity, Growth Factors and Adult Hippocampal Neurogenesis. **Curr Top Behav Neurosci 2012; doi: 10.1007/7854_2012_220.**

Völkel W, Sicilia T, Pähler A, Gsell W, Tatschner T, Jellinger K, Leblhuber F, Riederer P, Lutz WK, Götz ME. Increased brain levels of 4-hydroxy-2-nonenal glutathione conjugates in severe Alzheimer's disease. **Neurochem Int 2006; 48:679-686.**

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol 2007; 39:44-84.**

Wang R, Zhang HY, Tang XC. Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by beta-amyloid protein-(1-40) in rat. **Eur J Pharmacol 2001; 421:149-156.**

Winters BD, Saksida LM, Bussey TJ. Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. **Neurosci Biobehav Rev 2008; 32:1055-1070.**

Woods JA, Wilund KR, Martin SA, Kistler BM. Exercise, Inflammation and Aging. **Aging Dis 2012; 3:130-140.**

Yamamoto T, Ohkuwa T, Itoh H, Sato Y, Naoi M. Effect of gender differences and voluntary exercise on antioxidant capacity in rats. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2002; 132:437-444.**

Yuede CM, Zimmerman SD, Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM, Timson BF, Csernansky JG. Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of alzheimer's disease. **Neurobiol Dis 2009; 35:426-432.**

Zhang H, Ma Q, Zhang YW, Xu H. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. **J Neurochem 2012a; 1:9-21.**

Zhang C, Rodriguez C, Spaulding J, Aw TY, Feng J. Age-dependent and tissue-related glutathione redox status in a mouse model of Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis 2012b; 28:655-666.**

PERSPECTIVAS

Objetiva-se dar continuidade a este trabalho no doutorado. Em nosso entendimento, outros parâmetros precisam ser investigados no intuito de se compreender melhor os mecanismos envolvidos com a ação neuroprotetora do exercício físico sobre a doença de Alzheimer, assim como entendemos que precisamos utilizar um protocolo de treinamento físico com um controle mais rigoroso sobre a intensidade do esforço.

Com este propósito, objetiva-se planificar o treinamento físico dos animais com base no limiar anaeróbio. Objetivamos também utilizar camundongos transgênicos para a doença de Alzheimer portadores do gene humano da apolipoproteína E-4 (ApoE-4-Tg), a fim de investigar o papel do exercício como um agente terapêutico ante o principal fator de risco genético para a doença de Alzheimer. Finalmente, além dos parâmetros estudados no presente estudo, pretende-se investigar os níveis cerebrais de fatores de crescimento como IGF-1 e BDNF, marcadores de apoptose como a Caspase-3 e marcadores inflamatórios como IL-6 e COX-2.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

PROTOCOLO N° 012/2012

Título: Estudo do efeito neuroprotetor do exercício aeróbio no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos infundidos com beta-amilóide 1-40

Pesquisador: Cristiano Ricardo Jesse / Leandro Cattelan Souza

Campus: Itaqui

Telefone: (55)- 3433-1669

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br , leandrocattelan@hotmail.com

Após a análise detalhada do projeto de pesquisa a relatoria do CEUA-Unipampa emite parecer **FAVORÁVEL** para o cadastro do protocolo e execução do referido projeto.

Atenciosamente

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luiz E. Henkes'.

Luiz E. Henkes
Professor Adjunto
Coordenador da CEUA/Unipampa