

**Ísis Tacyana Gonçalves Soares Nascimento**

**Efeito do exercício prévio em esteira  
sobre os níveis de Fator Neurotrófico  
Derivado do Cérebro no sistema  
nervoso central e soro de ratos  
submetidos ou não a estresse agudo  
por contenção**

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte

2011

**Ísis Tacyana Gonçalves Soares Nascimento**

**Efeito do exercício prévio em esteira  
sobre os níveis de Fator Neurotrófico  
Derivado do Cérebro no sistema  
nervoso central e soro de ratos  
submetidos ou não a estresse agudo  
por contenção**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte

2011

Dissertação realizada no Laboratório Professora Conceição Machado do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Elizabeth Ribeiro da Silva e co-orientação da Prof<sup>a</sup>. Patrícia Massara Martinelli, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

**Dedico este trabalho a Deus e a minha  
querida mãezinha Sônia Maria Gonçalves**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a minha rocha e fortaleza, meu refúgio e consolador.

À Prof<sup>a</sup>. Elizabeth Ribeiro da Silva, pela orientação e profissionalismo necessários para a conclusão deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Patrícia Massara Martinelli pela orientação, paciência e auxílio, tornando este trabalho possível.

À amiga e colega de trabalho, Luciana Hoffert, grande exemplo, por sua amizade sincera, paciência e preciosos ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

Aos professores do Laboratório Prof<sup>a</sup>. Conceição Machado, pela compreensão e amizade.

Aos amigos do Laboratório Prof<sup>a</sup>. Conceição Machado, pela boa convivência e compreensão nos momentos difíceis.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório Prof<sup>a</sup>. Conceição Machado, em especial, ao amigo Lucas Kraemer Rocha, pelo cuidadoso trabalho e dedicação.

Ao técnico do laboratório, Carlos Henrique da Silva, pelas conversas edificantes, verdadeira amizade e grande apoio espiritual e técnico.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Neurociências.

Aos professores do Departamento de Morfologia.

Aos meus pacientes e seus familiares, por compreenderem em muitos momentos as necessárias mudanças de horários.

A minha família e amigos, pela compreensão nos momentos de ausência.

A todos os meus irmãos e irmãs em Cristo, verdadeiros amigos, na impossibilidade de nominar todos, por suas orações, palavras de aconchego e apoio incondicionais.

A todos os queridos irmãos e irmãs da Sexta Igreja Presbiteriana de Belo Horizonte, em especial ao Reverendo Leorges Fonseca, pelas constantes orações, apoio e amor.

A minha super mãe, meu exemplo de mulher, Sônia Maria Gonçalves, por seu amor e apoio incondicionais e principalmente por sua compreensão e sábios conselhos.

À minha madrinha, Olinda Gonçalves Lana, por seus “toques” de amor.

À minha grande amiga, Suzana Máira Barcelos, por ser sempre o meu ombro amigo e querida irmã de coração e fé.

Ao meu amor Tiago Lang, por em tão pouco tempo e justamente na reta final, me cobrir de cuidados, carinho, orações e amor, essenciais para a conclusão deste trabalho, juntos em Cristo.

À minha grande amiga, Cristal de Senna, por seu amor, carinho e verdadeira amizade terapêutica, essenciais para a conclusão deste trabalho.

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xi
Resumo.....	12
Abstract.....	13
<b>1 Introdução e justificativa.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>26</b>
2.1. Objetivo geral .....	26
2.2. Objetivos específicos .....	26
<b>3 Materiais e Métodos.....</b>	<b>27</b>
3.1 Animais.....	27
3.2 Delineamento Experimental.....	27
3.3 Aclimação à corrida em esteira.....	29
3.3.1 Avaliação de desempenho físico.....	29
3.3.2 Exercício Físico em Esteira.....	31
3.4 Estresse Agudo por Contenção.....	31
3.5 Morte dos Animais.....	32
3.6 Dosagem de BDNF por ELISA.....	33
3.7 Análise Estatística .....	34
<b>4 Resultados .....</b>	<b>36</b>
4.1. Peso corporal .....	36
4.2 Desempenho em esteira.....	37
4.3 Níveis de BDNF no hipocampo de animais jovens.....	38
4.4 Níveis de BDNF no hipocampo de animais adultos.....	39
4.5 Níveis de BDNF no cerebelo de animais jovens.....	40
4.6 Níveis de BDNF no cerebelo de animais adultos.....	41
4.7 Níveis séricos de BDNF em animais jovens.....	43
4.8 Níveis séricos de BDNF em animais adultos.....	44

<b>5. Discussão.....</b>	<b>45</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>50</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>51</b>
<b>8. Anexo.....</b>	<b>66</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
Ark	Serina-treonina cinase
AVP	Vasopressina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina sérica bovina
cAMP	Adenosina monofosfato
CEBIO	Centro de Bioterismo
CNTF	Fator Neurotrófico Ciliar
CREB	Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta ao AMPc (cyclic AMP response element-binding protein)
CRH	Hormônio Corticotrófico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ELISA	Ensaio de imunoadsorção conjugada à enzima (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
ERK	Quinase Regulada por Sinais Extracelulares (Extracellular signal Regulated Kinase)
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
GR	Receptor de Glicocorticóide
Grb2	Proteína 2 ligada à receptor de fator de Crescimento (Growth factor receptor-bound protein 2)
HCl	Acido Clorídrico
HPA	Eixo Hipotálamo-pituitária-adrenal
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MEK	Proteína cinase da família MAPKK
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MR	Receptor de Mineralocorticóide
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NGF	Fator de Crescimento Neural
NT	Neurotrofina

NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
NT-6	Neurotrofina 6
NT-7	Neurotrofina 7
OMS	Organização Mundial de Saúde
P75 <sup>NTR</sup>	Receptor p75
PBS	Tampão salina fosfato
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Trk	Receptor do tipo tirosina cinase
TrkA	Receptor do tipo tirosina cinase A
TrkB	Receptor do tipo tirosina cinase B
TrkC	Receptor do tipo tirosina cinase C
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.....	15
Figura 2. Vias moleculares do BDNF.....	21
Figura 3. Procedimentos experimentais realizados em ratos Wistar jovens e adultos.....	28
Figura 4. Esteira elétrica marca Gaustec Magnetismo. Vista Lateral.....	29
Figura 5. Contensores utilizados para contenção de ratos Wistar adultos (A) e jovens (B).....	32
Figura 6. Curva de calibração para ELISA (BDNF).....	34
Figura 7. Peso corporal médio de ratos jovens controles e exercitados.....	36
Figura 8. Peso corporal médio de ratos adultos controles e exercitados.....	36
Figura 9. Trabalho médio (Kg.m) ratos jovens e adultos.....	37
Figura 10. Velocidade correspondente ao trabalho médio realizado por ratos jovens e adultos.....	38
Figura 11. Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no hipocampo de ratos jovens controle, exercitados e estressados.....	39
Figura 12. Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no hipocampo de ratos adultos controle, exercitados e estressados.....	40
Figura 13. Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no cerebelo de ratos jovens controle, exercitados e estressados.....	41
Figura 14. Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no cerebelo de ratos adultos controle, exercitados e estressados.....	42
Figura 15. Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no cerebelo de ratos jovens e adultos, controle e exercitados.....	42
Figura 16. Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no soro de ratos jovens controle, exercitados e estressados.....	43
Figura 17. Níveis de BDNF (pg/mg de proteína total) no soro de ratos adultos controle, exercitados e estressados.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos descritos a respeito do exercício físico e estresse agudo para diferentes idades.....	25
Tabela 2. Número de ratos Wistar jovens e adultos submetidos a exercício físico regular e a estresse agudo por contenção e seus respectivos controles.....	28
Tabela 3. Exemplo de avaliação de desempenho de rato jovem.....	30

## Resumo

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito do exercício em esteira sobre a expressão de BDNF no hipocampo, cerebelo e soro de ratos jovens e adultos submetidos a estresse agudo por contenção. Utilizaram-se 29 ratos Wistar machos jovens (27 dias) e 25 ratos machos adultos (180 dias). O exercício em esteira consistiu de corrida em esteira, de intensidade moderada, por 30 minutos diários, durante 3 semanas. A velocidade da esteira foi determinada após a avaliação do desempenho físico de cada um dos animais, correspondendo a 50-60% do trabalho realizado durante a avaliação de modo a atingir exercício forçado de intensidade moderada. Os animais controles foram submetidos à avaliação de desempenho, mas não ao exercício em esteira, permanecendo em suas gaiolas durante as 3 semanas do período de exercício. Os animais controles e os exercitados foram submetidos a estresse agudo por contenção durante 120 minutos e mortos imediatamente ou após 60 minutos. Os níveis de BDNF no hipocampo, cerebelo e soro foram avaliados por ELISA (média  $\pm$  desvio padrão, pg/mg de proteína total para o tecido e pg/mL para soro).

Nossos resultados mostram que em ambos os grupos jovens e adultos, o exercício em esteira pelo período de 3 semanas não alterou a expressão de BDNF no hipocampo e cerebelo. Por sua vez, os grupos jovens e adultos submetidos ao estresse agudo por contenção demonstraram redução dos níveis de BDNF no hipocampo, independentemente de exercício físico prévio. Porém, os animais jovens exibiram maior resistência ao estresse agudo por contenção, pois a redução dessa neurotrofina ocorreu apenas sessenta minutos após o período de estresse. Já os animais adultos exibiram diminuição significativa dos níveis de BDNF imediatamente após o estresse agudo por contenção. Em relação ao cerebelo, não se observou diferença significativa entre os grupos experimentais, ou seja, o estresse por contenção não alterou os níveis de BDNF neste órgão. Em relação aos níveis séricos de BDNF, os animais submetidos a exercício físico prévio ao estresse agudo por contenção apresentaram valores mais elevados que os animais controles, 60 minutos após o período de estresse.

## Abstract

This study aims to evaluate the effect of treadmill on the expression of BDNF in the hippocampus, cerebellum and serum from young and adult rats submitted to acute restraint stress. Twenty-nine young (27 days) and twenty-five adult (180 days) male Wistar rats were used in this study. Moderate-intensity treadmill running was performed daily for 30 min over three weeks. Their running speed was determined according to their individual running performance during the evaluation, corresponding to 50–60% of the workload to achieve moderate-intensity forced exercise. Control animals were submitted to individual running performance but not to treadmill exercise, staying in their cages over the period of treadmill running. Control and exercised animals were submitted to acute restraint stress for 120 minutes and then killed immediately or 60 minutes after the restraint stress. The levels of BDNF in the hippocampus, cerebellum and serum were measured by ELISA (mean  $\pm$  SD, pg / mg total protein for tissue and pg / mL for serum).

Our results show that in both young and adult rats the 3-week period of treadmill running did not change the expression of BDNF in the hippocampus, cerebellum and serum. On the other hand, both young and adult rats submitted to restraint stress exhibited lower BDNF levels in the hippocampus, independently on previous treadmill running. However, young rats exhibited a greater resistance to acute restraint stress, since the BDNF levels were reduced only after 60 minutes. In this way, the adult rats showed significant reduction in the hippocampus BDNF levels immediately after restraint stress. Concerning the cerebellum, there was no difference among all the experimental groups, i.e., the acute restraint stress was not able to change the BDNF levels in this organ. Concerning the serum levels of BDNF, the rats submitted to previous treadmill running showed higher values than the control ones 60 minutes after the restraint stress.

# **1 INTRODUÇÃO**

## 1 Introdução e Justificativa

O estresse é reconhecido em sua cronicidade e identificado como o mal do século XXI, segundo a Organização Mundial da Saúde (2010). Suas repercussões estão diretamente ligadas a qualidade de vida do indivíduo, da família, da sociedade e aceito como um dos principais fatores de risco das doenças cardiovasculares (Ministério da Saúde, 2008). É entendido como um processo complexo e multidimensional em que atuam estressores físicos e/ou psicológicos, sendo definido como um estado de ameaça à homeostase corporal e ao bem estar. O estresse está relacionado ao cotidiano vivenciado pelo sujeito, tornando-se assim um desafio para a sobrevivência do organismo (McEwen e Lasley, 2003; revisto por Ulrich-Lai e Herman, 2010).

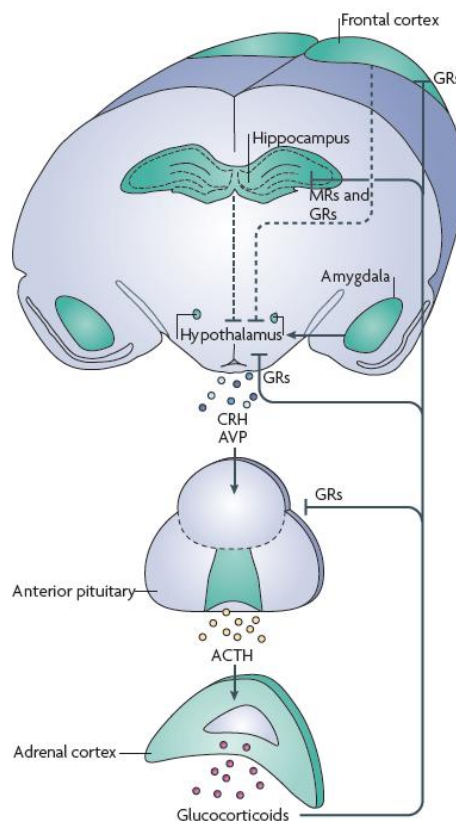
Em seu trabalho pioneiro, Hans Selye descreveu, em 1936, que após exposição ao frio, trauma cirúrgico, exercício muscular excessivo ou intoxicações, ratos apresentavam respostas típicas independentes da natureza do agente agressor. Àquela época, Selye introduziu o conceito de “uma síndrome de adaptação geral produzida por diversos agentes nocivos”, a qual englobava reações sistêmicas envolvidas em estados de alarme, resistência e exaustão (Selye, 1936), tais como aumento da glândula adrenal, atrofia de órgãos do sistema linfóide e ulcerações gástricas. Para este autor, a síndrome abrangia três fases ou períodos, um inicial de adaptação seguido por período prolongado de resistência e, por fim, de exaustão e morte.

Walter Cannon (1940) também reconheceu a existência de uma tensão emocional similar a envolvida com a reação física ao calor, frio e dor descrita por Selye. Em seguida, Geoffrey Harris (1950) estabeleceu que a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) induzida pela síndrome de adaptação geral dependia de controle do hipotálamo e do sistema porta hipotalâmico-hipofisário.

O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) é hoje reconhecido como a chave efetora em resposta ao estresse (Fig. 1). Os hormônios glicocorticóides liberados pela glândula adrenal em resposta à ativação do HHA são agentes importantes na adaptação fisiológica do organismo para manutenção da homeostase e, por isso, atuam na fronteira entre estresse e doença (revisão por Lupien *et al.*, 2009).



Os neurônios da área parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo secretam o fator de liberação da corticotropina (CRH) de forma cíclica, com frequência de dois a três episódios de secreção por hora. Sua secreção está aumentada nas primeiras horas da manhã em seres humanos e, em roedores, nas primeiras horas da noite (Stone *et al.*, 2001). Durante o estresse agudo, a secreção do CRH aumenta acentuadamente devido a hiperatividade do eixo HPA, resultando em aumento da secreção de ACTH, regulador chave dos glicocorticóides pelo córtex adrenal (Young *et al.*, 2001).



**Figura 1:** Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Lupien *et al.*, 2009).

Os corticosteróides do tipo glicocorticóide ligam-se a dois diferentes receptores intracelulares: o receptor de mineralocorticóide (MR) e o receptor de glicocorticóide (GR) (revisado por Korte, 2001). Os MR apresentam menor sensibilidade a glicocorticóides, sendo ativados em resposta a alta concentração desses hormônios, como no pico diurno em humanos ou em resposta ao estresse. Os GRs apresentam-se em alta densidade nas áreas encefálicas relacionadas à regulação do medo, ansiedade, aprendizado e memória, como a amígdala, córtex frontal e hipocampo. Nos seres humanos,

os principais glicocorticóides encontrados são o cortisol e a cortisona, embora as adrenais liberem também a corticosterona, em menor quantidade. Quando há um déficit na liberação do cortisol, a corticosterona passa a ser o principal glicocorticóide humano (Choi *et al.*, 2008).

O estresse atua também sobre o sistema nervoso autônomo (SNA) e sobre áreas noradrenérgicas centrais como *locus ceruleous* (revisto por Tsigos e Chrousos, 2002). O sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático, leva a alterações rápidas nos estados fisiológicos, devido à inervação direta do órgão alvo, por exemplo, elevando rapidamente a frequência cardíaca e a pressão arterial (vasoconstrição). Assim como a excitação rápida, a ação do SNA diminui rapidamente devido ao reflexo parassimpático, resultando em respostas de curta duração. Em contrapartida, na ativação do eixo HHA, o pico dos níveis plasmáticos de glicocorticóides ocorre apenas dezenas de minutos após o início do estímulo estressor (Shermann *et al.*, 2009). O *locus ceruleous*, localizado no tronco encefálico, atua em situações de alarme, particularmente relacionadas às informações sensoriais; secreta noradrenalina e contribui para as respostas autonômicas e neuroendócrinas ao estresse, incluindo ativação do eixo HPA.

A exposição aos hormônios do estresse apresenta impactos distintos nas estruturas cerebrais envolvidas com a cognição e áreas límbicas nas diferentes fases do desenvolvimento, período pré-natal, infância, adolescência, juventude, idade adulta ou na velhice (Bloss *et al.* 2010; Del Arco *et al.*, 2011). Durante a infância, o cérebro humano é particularmente sensível ao estresse. Em ratos, há período de baixa resposta ao estresse nas duas primeiras semanas após o nascimento, em que o HHA responde pouco a estímulos ambientais e a secreção de glicocorticóides é baixa. No entanto, a existência deste período refratário é dependente da presença materna (Levine, 1994).

O estresse agudo, assim como o crônico, são capazes de levar à significativa redução da arborização dendrítica nas regiões do giro do cíngulo, hipocampo, região da amígdala e córtex pré frontal, além de predispor a comportamentos ansiosos e depressivos, demonstrando a influência direta do estresse no sistema nervoso central (Lupien *et al.* 2009).

A utilização de modelos experimentais é fundamental para o entendimento dos mecanismos subjacentes à resposta ao estresse. A partir de

estudos experimentais, verificaram-se diversos fatores capazes de influenciar o padrão e a magnitude da resposta ao estresse, incluindo a duração da exposição ao estresse (agudo versus crônico), o tipo de estresse (físico versus psicológico), o contexto do estresse (por exemplo, o horário do dia), o estágio de desenvolvimento do animal (recém-nascido, jovem, adulto ou idoso) e o sexo do animal (macho ou fêmea).

Diferentes tipos de estressores podem induzir respostas distintas em populações neuronais específicas. Os estressores físicos, tais como hipoglicemia, hemorragia, frio ou calor rapidamente recrutam populações neuronais do tronco cerebral e hipotálamo, levando assim à resposta rápida do sistema nervoso autônomo. Os estressores psicológicos, como isolamento social, privação de sono, privação materna, exposição a uma ameaça, contenção em espaço restrito, imobilização, envolvem regiões encefálicas como a amígdala, o córtex prefrontal e o hipocampo. No entanto, essa segregação muitas vezes mostra-se artificial, de modo que estressores físicos e psicológicos podem induzir respostas em áreas ou regiões cerebrais semelhantes (revisto por Joëls *et al.*, 2009).

A duração da aplicação do estressor também influencia a natureza da resposta neuronal. Estressores agudos (único evento, por tempo limitado, com duração dentre minutos e horas) levam à ativação neuronal e liberação hormonal, envolvendo principalmente o sistema nervoso autônomo. Esse aumento é seguido, após o evento estressor agudo, por um rápido retorno aos níveis basais, embora a ativação temporária, por exemplo, do hipocampo, possa levar também a alterações morfológicas. Já o estresse crônico (com exposição prolongada, com duração dentre uma semana ou mais) provoca de forma contínua e sustentada mudanças progressivas na expressão de genes específicos, levando a alterações estruturais neuronais, além da ativação do eixo HPA (revisto por Pacák e Palkovits, 2001; Veenema *et al.*, 2003).

Pacák *et al.* (1998) avaliaram a concentração plasmática de noradrenalina, adrenalina e ACTH em ratos adultos Sprague Dawley, após exposição aguda a cinco diferentes estressores. Os estressores utilizados foram: imobilização por duas horas; hemorragia para indução de hipotensão; exposição ao frio (3 a 4°C, por três horas); dor (evocada por administração subcutânea de 1% ou 4% de formol) ou hipoglicemia (evocada por

administração intravenosa de insulina). A imobilização demonstrou ser o estressor capaz de induzir a maior concentração plasmática de ACTH. Em relação à noradrenalina, a exposição ao frio demonstrou ser a mais eficiente para estimular sua produção, seguida por imobilização.

Hans Selye (1936) foi o primeiro pesquisador a utilizar o modelo de estresse por imobilização, mediante o envolvimento firme do rato com uma toalha. Posteriormente, o modelo se tornou difundido, porém com variações quanto aos procedimentos utilizados para imobilização do animal. Pacák e Palkovits (2001) utilizaram armação de metal para a imobilização das patas de ratos para manutenção do animal em posição prona. Já Smith e Cizza (1996) e Ueyama *et al.*, (1997) utilizaram a fixação dos animais por meio de fita adesiva transpassada em todo o tronco e membros dos ratos, os quais permaneceram presos a uma placa de metal, em posição prona. Por sua vez, Lee *et al.* (2008) imobilizaram ratos adultos, na posição supina, em uma placa de madeira, utilizando cintos de couro para fixar o tronco do animal e fita adesiva para os membros, que permaneciam em ângulo de 45 graus em relação ao tronco.

A imobilização é considerada um estressor de caráter físico e psicológico, pois, além de envolver regiões encefálicas relacionadas à emoção, é capaz de levar à alteração da temperatura corporal, à restrição respiratória e a estímulo doloroso (revisado por Pacák e Palkovits, 2001).

A imobilização se diferencia do modelo de contenção animal, apesar de, na literatura, muitas vezes os vocábulos serem usados como sinônimos. Wang *et al.* (2008) descreveram o uso da imobilização para induzir o estresse em ratos Sprague–Dawley, adultos, porém ao descreverem o método relataram ter utilizado tubos plásticos para conter os animais.

A imobilização impossibilita o animal de realizar qualquer movimentação, com exceção de movimentos sutis das vértebras cervicais. Por outro lado, no modelo de contenção, os roedores são submetidos a uma restrição de locomoção, mas a movimentação corporal é possível. O animal não é fisicamente comprimido e não há sensação de dor ou alterações respiratórias (Morais 2010). Acredita-se ser um modelo de estresse de natureza psicológica, devido à sensação de confinamento do animal, capaz de afetar parâmetros

endócrinos, incluindo o sistema nervoso autônomo e o eixo HPA (Keim e Sigg, 1976; Glavin *et al.*, 1994).

Os mecanismos regulatórios e modulatórios da neuroplasticidade estão diretamente ligados ao estímulo e a secreção de fatores neurotróficos. Esses fatores são definidos como polipeptídeos capazes de promoverem a regulação dos processos de diferenciação, manutenção e sobrevivência das células neurais, participando ativamente na neuroplasticidade e neurogênese do sistema nervoso central e periférico (Chiaretti *et al.*, 2004; Alberch *et al.*, 2002).

Os experimentos iniciais que levaram à identificação de fatores neurotróficos partiram dos laboratórios de Viktor Hamburger e Rita Levi-Montalcini, nos anos 50. Levi-Montalcini descreveu a secreção de um fator pela célula-alvo de uma determinada população neuronal, sua captação pela terminação nervosa pré-sináptica e transporte retrógrado até o corpo neuronal. Esse agente foi posteriormente denominado Fator de Crescimento Neural (*Nerve Growth Factor* - NGF), atuante sobre neurônios simpáticos e sensoriais. Rita Montalcini recebeu o Prêmio Nobel de Medicina (Fisiologia), em 1986, por seus trabalhos sobre identificação e função de fatores neurotróficos (Cohen e Levi-Montalcini, 1956; revisado por Cohen, 2008).

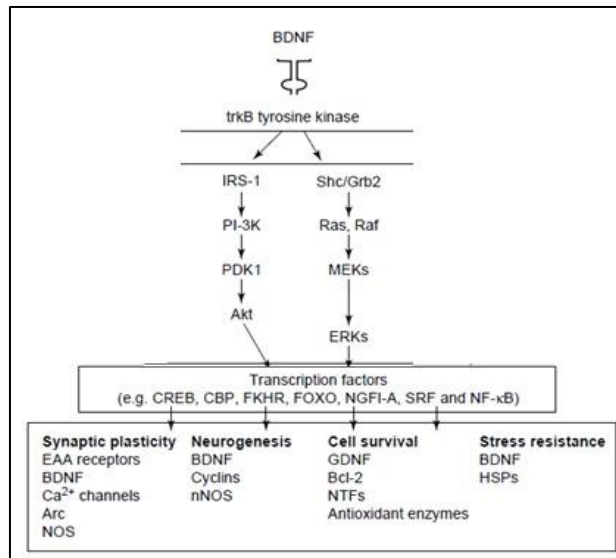
A partir de Levi-Montalcini e Cohen, o progresso nas pesquisas se manteve e, juntamente a esse avanço, a descoberta de demais fatores neurotróficos. Esses fatores são agrupados em famílias: neurofinas (NT) que compreendem o NGF, o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor* – BDNF), NT-3, NT-4/5, NT-6 e NT-7; família do Fator Neurotrófico Derivado da Glia (*Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor* – GDNF): GDNF, persefina, neurturina; Fator de Crescimento Fibroblástico (*Fibroblastic Growth Factor* – FGF) e o Fator Neurotrófico Ciliar (*Ciliary Neurotrophic Factor* – CNTF) (Skaper e Walsh, 1998; Price *et al.*, 2007).

As neurotrofinas atuam nas células-alvo por meio de ligação não covalente com receptores transmembrana específicos da família dos receptores tirosina cinase (Trk). O NGF interage com o receptor TrkA; o BDNF liga-se ao receptor TrkB ao qual se liga também a NT-4/5. Já a NT-3 interage, principalmente, com o receptor TrkC. As neurotrofinas se ligam, também, ao receptor de baixa afinidade ou baixa especificidade p75<sup>NTR</sup> (p75 *neurotrophins receptor* ou p75) (Hallbook *et al.*, 2006).

O Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) foi identificado por Barde *et al.* (1982) a partir de experimentos com homogeneizado de cérebro de porco, representando o segundo fator neurotrófico a ser purificado, depois do NGF. Seu papel está diretamente ligado ao desenvolvimento do sistema nervoso, como também em processos relacionados à plasticidade cerebral envolvendo a memória e o aprendizado, sendo sua principal fonte o hipocampo. O BDNF apresenta altos níveis de expressão nas regiões do córtex, hipocampo e cerebelo, sendo o seu receptor TrkB também amplamente expresso no córtex cerebral, hipocampo, região do giro denteado, e região dos neurônios ganglionares e de Purkinje cerebelares (Klintsova *et al.*, 2004)

O BDNF é inicialmente sintetizado como um precursor, proBDNF, que pode ser clivado no interior da célula e originar a forma madura. Alternativamente, a forma imatura pode ser secretada e, no meio extracelular, ser clivado por ação de metaloproteinases de matriz (MMP), como por exemplo, a plasmina (Martinowich *et al.*, 2007).

A ligação do BDNF com o seu receptor TrkB causa dimerização induzida pelo ligante, que acaba por recrutar várias proteínas adaptadoras e enzimas que propagam a sinalização desencadeada pelo BDNF. O receptor TrkB ativado serve como local de reconhecimento para moléculas efetoras, por exemplo, Shc e Grb2, que ativam a proteína Ras, que por sua vez, fosforila Raf-1. A partir desse evento, há a fosforilação das isoformas de MAP cinase, ERK-1 e ERK-2, que no interior do núcleo, irão promover a transcrição de sinal conduzida por promotores distintos, modulados por mecanismos de sinalização, incluindo cálcio, CREB, MEK. Além dessa via de sinalização, outra pode ser ativada, como a fosfatidilinositol-3 cinase (PI-3 cinase), importante para a diferenciação e sobrevivência neuronal. Nesta via há ativação de proteínas cinases como serina-treonina cinase (Ark). Vale ressaltar que a via de sinalização PI-3 cinase pode ser também desencadeada por meio da ativação da via Ras-MAP cinase (Figura 2) (Skaper e Walsh, 1998; Rose *et al.*, 2003; Mattson *et al.*, 2004).



**Figura 2:** Vias moleculares do BDNF (modificado de Mattson *et al.*, 2004).

O BDNF tem sua expressão diminuída na região do hipocampo de ratos adultos, em resposta ao estresse agudo por contenção (Alboni *et al.*, 2011). Muramaki *et al.* (2005), mostraram que a contenção de ratos, por duas horas, é capaz de produzir uma resposta estressora em relação aos níveis de corticosterona, significativamente maior quando comparada à contenção por seis horas. Ao contrário, os níveis de BDNF diminuem significativamente no hipocampo após seis horas de contenção.

O estresse agudo de contenção, durante duas horas, é capaz de alterar a neurotransmissão sináptica por meio da fosforilação da proteína CREB, via AMPc, sugerindo que o mesmo pode regular a transcrição gênica do BDNF (Fuchikami *et al.*, 2009).

Tognoli *et al.* (2010) também sugerem que a redução da expressão do BDNF, após exposição ao estresse agudo, pode ser devida à alteração da transcrição do BDNF. Tais achados demonstram um aumento significativo nos níveis de proBDNF, porém com significativa redução da forma madura de BDNF. Os autores concluíram que a redução dos níveis de BDNF, devido exposição ao estresse, está relacionada com o processamento do proBDNF para a forma madura de BDNF.

Outro fator capaz de interferir nos níveis de BDNF é o envelhecimento, podendo ser potencializado com a ação do estresse. A perda de neurônios hipocampais é descrita também com o avançar da idade, porém podendo ser

prevenida em ratos, por meio de adrenalectomia; ou acelerada, por exposição prolongada a altas concentrações de glicocorticóides (Sapolsky *et al.*, 1985). Na mesma direção, Woolley *et al.* (1990) após tratarem ratos adultos com injeções diárias de 10 mg de corticosterona durante 21 dias, observaram uma significativa redução do número de ramificações dendríticas e no comprimento total de dendritos na região hipocampal CA3, quando comparados aos controles *sham* e não tratados, demonstrando que o efeito do estresse pode reforçar a perda neuronal advinda do envelhecimento.

O envelhecimento leva a declínio da função cerebral devido à alterações na expressão do BDNF, como descrito por Smith *et al.* (1996). Primeiramente, os autores examinaram o efeito do envelhecimento sobre o BDNF no hipocampo de ratos de dois, oito, 18 e 24 meses de idade. Os resultados mostraram que os níveis de BDNF no hipocampo reduziram-se, significativamente (10-25%), apenas entre as idades de 18 e 24 meses. Quando submetidos a estresse agudo, por duas horas, observou-se uma redução significativamente maior do BDNF no hipocampo dos ratos adultos (3-4 meses) e velhos (24 meses).

Llorente *et al.* (2009) demonstraram que apenas um episódio agudo de estresse é capaz de levar à degeneração neuronal no hipocampo e cerebelo de ratos recém-nascidos submetidos a 24 horas de privação materna, demonstrando assim a sensibilidade de tais estruturas aos efeitos dos elevados níveis de glicocorticóides.

Ueyama *et al.* (1997) demonstraram que ratos Wistar jovens (dois meses), expostos a um único evento estressor de imobilização (oito horas), reduzem significativamente os níveis de RNAm para BDNF e a afinidade do BDNF pelo seu receptor TrkB na região hipocampal. Por sua vez, Sei *et al.* (2000) demonstraram que o estresse agudo por contenção por seis horas é capaz de reduzir os níveis de BDNF no cerebelo de ratos jovens, porém não sendo percebido o mesmo resultado no hipocampo.

Assim, é possível estabelecer uma correlação do BDNF com os níveis séricos de corticosteróides, porém sem ainda um consenso a respeito da influência das idades e modelo de estresse nesta relação.

Os fatores neurotróficos exercem ação protetora cerebral, podendo ser eficazes na prevenção ou reversão induzida por danos causados pelo estresse.



O efeito do exercício físico sobre a preservação da função neuronal tem sido estudado por meio de modelos experimentais e em humanos, envolvendo a plasticidade neuronal, incluindo aumento da expressão de fatores neurotróficos, principalmente o BDNF (Neeper *et al.*, 1996; Ying *et al.*, 2005).

Estudos com humanos sugerem que a prática de exercícios físicos na vida jovem e durante o envelhecimento, principalmente a partir da quinta década de vida, pode proteger contra o desenvolvimento de déficits cognitivos e sintomas depressivos, através do aumento da expressão do BDNF, sendo também de fundamental auxílio na recuperação funcional (Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005). Churchill *et al.* (2002) sugeriram que a prática de exercício físico regular, como caminhada, corrida, natação e ciclismo, fomenta estratégias terapêuticas utilizadas para impedir o declínio cognitivo associado ao envelhecimento.

Os modelos experimentais de exercício físico diferenciam-se pela prática de atividade física voluntária ou pelo exercício físico regular. O modelo animal de atividade física voluntária mais comumente utilizado é a roda de corrida e para o exercício físico forçado, a corrida em esteira elétrica ou a natação (Tillerson *et al.*, 2003).

Vaynman e Gomez-Pinilla (2005) demonstraram que a expressão do BDNF encontra-se aumentada após a prática de atividade física voluntária, em diversas regiões encefálicas de ratos Wistar adultos, como hipocampo, córtex cerebral caudal, córtex prefrontal e cerebelo. O aumento nos níveis de BDNF tem sido foco de grande interesse nos estudos relacionados à plasticidade neuronal associada à prática de exercícios físicos.

O exercício físico regular é capaz de ativar cascatas sinalizadoras que promovem e mantêm a plasticidade cerebral (Tong *et al.*, 2001; Cotman e Berchtold, 2002). Molteni *et al.* (2002) estudaram a neuroproteção desencadeada por atividade física voluntária, em roda de corrida para ratos jovens. Os resultados mostraram um aumento da expressão de BDNF no hipocampo, após a prática de atividade física, interferindo também nas terminações pré e pós-sinápticas. A transdução do sinal do BDNF, mediada principalmente por seu receptor TrkB (cuja expressão demonstrou-se também aumentada pela atividade física) resulta no aumento da expressão de BDNF. Ademais, a atividade física atua sobre proteínas imprescindíveis para a

transmissão sináptica, como a sinapsina e sinaptofisina, modulando assim a liberação de neurotransmissores.

Neste ponto, destacamos dois conceitos comumente utilizados na literatura. Entende-se por atividade física qualquer movimento corporal, produzido pelos músculos esqueléticos, que resulta em gasto energético maior do que os níveis de repouso; e exercício físico, caracterizado como atividade física planejada, regular, estruturada e repetitiva, que tem como objetivo aumentar ou manter a aptidão física (Caspersen *et al.*, 1985).

Contarteze *et al.* (2007) compararam os biomarcadores de estresse (ACTH e corticosterona) em ratos Wistar adultos durante o exercício físico em esteira elétrica e natação. O grupo de natação mostrou concentrações significativamente mais elevadas de ambos os hormônios em relação ao grupo de corrida em esteira. Demonstrando, assim, ser a natação uma atividade mais estressante em relação à corrida em esteira elétrica.

Hayes *et al.* (2008) avaliaram o efeito do exercício físico regular em esteira, atividade física voluntária e do estresse, em ratos adultos, submetidos a acidente vascular encefálico. Os resultados demonstraram nível de corticosterona significativamente superior em ambos os grupos, estressado e exercício físico em esteira, quando comparados ao grupo de atividade física voluntária. Porém, o volume de infarto demonstrou-se significativamente reduzido apenas no grupo que realizou exercício físico forçado em esteira por cinco semanas. Foi sugerido que o exercício físico forçado em esteira, com controle da velocidade, intensidade e tempo de treinamento (30 minutos por dia), apesar de apresentar um componente estressante, é capaz de induzir uma maior neuroproteção, quando comparado ao voluntário.

Apesar de os elevados níveis de glicocorticoides serem relacionados à supressão do BDNF no hipocampo de ratos, estudos demonstram que o exercício físico em esteira, para animais jovens e adultos, é capaz de aumentar significativamente não apenas os níveis de BDNF, mas também a expressão de seu receptor, trkB (Kim *et al.*, 2005; Lou *et al.*, 2008).

Huang *et al.* (2006) descrevem a atividade física voluntária como um modelo compulsivo, de difícil controle dos parâmetros a respeito da duração, intensidade e tempo relativo à última sessão de corrida feita pelo animal. Além disso, a inclusão da roda de corrida na gaiola do animal faz com que não se

possa descartar os efeitos de ambiente enriquecido (Smith *et al.*, 1998). Ademais, Young *et al.* (1999) ressaltam que roda de corrida inserida na gaiola do animal pode ser fator de enriquecimento ambiental e levar ao aumento da sobrevivência e resistência de neurônios a insultos cerebrais, além de aumentar a vascularização cerebral e estimular a neurogênese, por aumentar a expressão do BDNF.

A Tabela 1 resume os principais dados referentes a expressão de fator neurotrófico no SNC em condição de estresse e de exercício físico.

**Tabela 1** – Expressão de fator neurotrófico BDNF em ratos submetidos a estresse e a exercício físico.

Autores	Idade	Estrutura	Estresse Agudo	Estresse Crônico	Exercício Físico (Esteira)
<b>Smith et al. (1996)</b>	2,8,18,24 meses	Hipocampo	BDNF (2 e 24 meses)	-	-
<b>Sei et al. (2000)</b>	Jovem	Hipocampo e Cerebelo	BDNF (apenas cerebelo)	-	-
<b>Muramaki et al. (2005)</b>	Jovem	Hipocampo	BDNF	BDNF	-
<b>Alboni et al. (2011)</b>	Adulto	Hipocampo	BDNF	-	-
<b>Toth et al. (2008)</b>	Jovem e Adulto	Hipocampo	-	BDNF (jovem) e BDNF (adulto)	-
<b>Cechetti et al. (2008)</b>	Jovem	Hipocampo e Cerebelo	-	-	Não alterou
<b>Kim et al. (2005) e Lou et al. (2008)</b>	Jovem e Adulto	Hipocampo	-	-	BDNF

Nossa hipótese de trabalho é que o exercício físico diário, em esteira, seja capaz de alterar a resposta do sistema nervoso central ao estresse agudo por contenção, em ratos. Com este trabalho pretendemos contribuir para o conhecimento sobre os efeitos do exercício físico prévio ao estresse agudo por contenção sobre os níveis de BDNF no sistema nervoso central e soro, em animais jovens e adultos, com vistas a investigar a relação entre idade e a resposta ao estresse e ao exercício físico.

## **2 OBJETIVOS**

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do exercício físico regular em esteira sobre a expressão de BDNF no hipocampo, cerebelo e soro de ratos jovens e adultos submetidos ao estresse agudo por contenção.

### **2.2 Objetivos específicos**

Pretende-se avaliar, em animais jovens e adultos, submetidos ou não a exercício físico regular em esteira e, em seguida, a estresse agudo por contenção:

- Níveis de BDNF no hipocampo;
- Níveis de BDNF no cerebelo;
- Níveis séricos de BDNF.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3 Materiais e métodos**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos (n= 54) provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte. Ao serem retirados do CEBIO, os animais estavam com a idade de 21 dias e, a partir de então, permaneceram no biotério de experimentação do Departamento de Morfologia (ICB-UFMG) até o dia da morte. Os animais foram mantidos em estantes climatizadas (Alesco) a 21°C, em gaiolas plásticas, recebendo ração comercial (Nuvilab) e água à vontade. Todos os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, em que as luzes eram acesas às 07:00 e desligadas às 19:00 horas. Em cada gaiola mantiveram-se, em média, quatro animais.

#### **3.2 Delineamento Experimental**

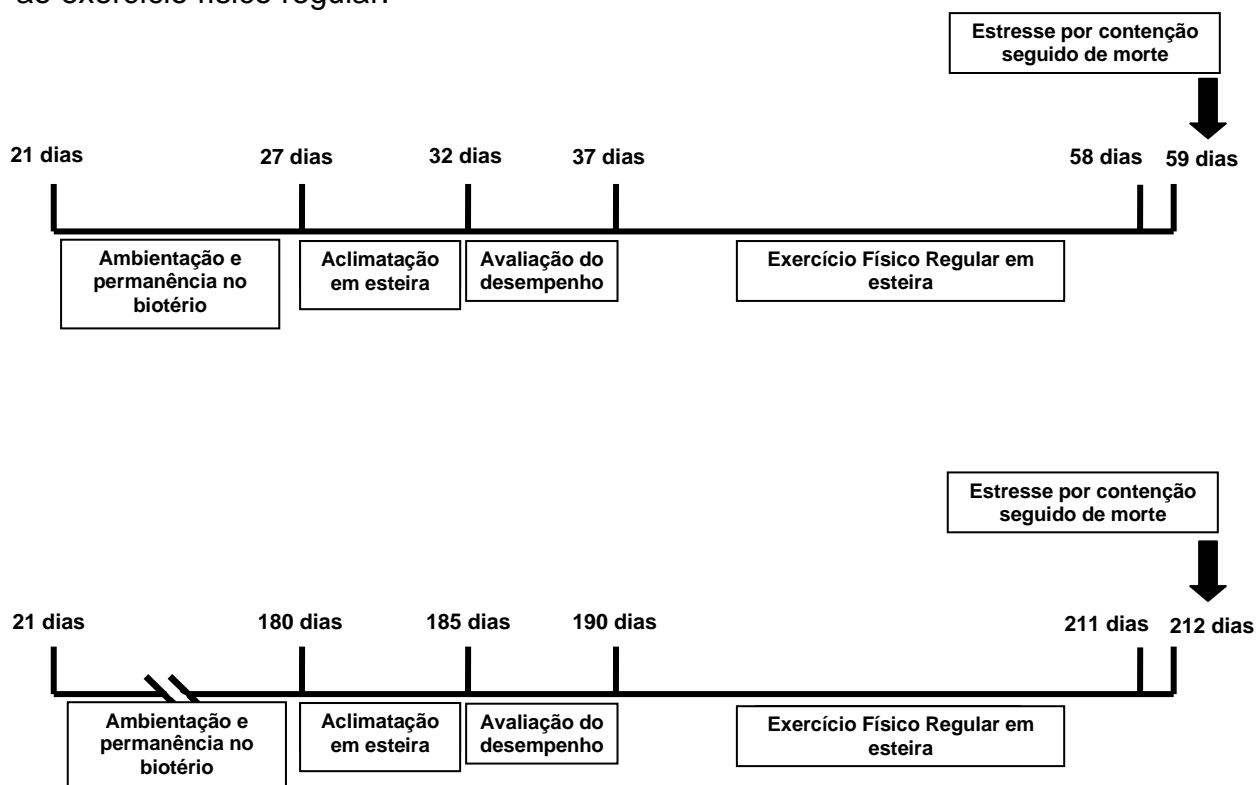
Todos os animais foram pesados semanalmente (balança Precision Pr300) ao longo do período experimental. Dois animais apresentaram perda acentuada de peso, lesões de pele e/ou alopecia e foram excluídos dos grupos experimentais. Os procedimentos experimentais executados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFMG, sob o protocolo 069/2006. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos experimentais (Tabela 1).

**Tabela 2** – Número de ratos Wistar jovens e adultos submetidos a exercício físico regular e a estresse agudo por contenção e seus respectivos controles

Grupos Experimentais	Controle	Exercitado	Exercitado + Estresse T <sub>0</sub> *	Controle + Estresse T <sub>0</sub> *	Exercitado + Estresse T <sub>60</sub> *	Controle + Estresse T <sub>60</sub> *
Jovens	5	4	5	5	5	5
Adultos	5	7	7	6	-	-

\* (T<sub>0</sub>) (T<sub>60</sub>) referem-se ao tempo após o estresse (em minutos), em que o animal foi morto

A Figura 3 sintetiza o delineamento experimental utilizado neste projeto. Os animais do grupo controle foram expostos à aclimação em esteira e à avaliação de desempenho físico, assim como os do grupo exercitado, mas não ao exercício físico regular.



**Figura 3** - Procedimentos experimentais realizados em ratos Wistar jovens e adultos.



### 3.3 Aclimação à corrida em esteira

O procedimento de aclimação ocorreu a partir do 27º dia de idade para os animais jovens e a partir do 180º dia de idade para os animais adultos. Por cinco dias consecutivos os ratos foram expostos, durante cinco minutos, ao aparato da esteira elétrica (Gaustec Magnetismo) desligada para adaptação ao ambiente de atividade locomotora. Os animais eram colocados individualmente em cada uma das cinco baias opacas (Fig. 4).



**Figura 4** - Esteira elétrica marca Gaustec Magnetismo. Vista Lateral.

Decorrido esse tempo, a esteira, mantida constantemente com inclinação de 15º, era ligada e a velocidade aumentada gradualmente, um metro a cada seis segundos, até atingir a velocidade de dez metros por minuto. Os ratos foram, então, estimulados a locomoverem-se sobre a pista durante mais cinco minutos. Cada uma das baias contava com uma grade com estimulação elétrica na extremidade posterior utilizada para estimular a corrida dos animais. A extremidade anterior da esteira era provida de uma peça de acrílico escuro, para que a corrida ocorresse em ambiente escurecido e confortável ao animal. A esteira permaneceu no biotério de Departamento de Morfologia (ICB-UFMG) durante todo o experimento.

#### 3.3.1 Avaliação de desempenho físico

Após aclimação, os animais foram submetidos à avaliação individual do desempenho físico, sob orientação do Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra, Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, do Departamento de Fisiologia e

Biofísica (ICB/UFMG). A avaliação foi realizada a partir do 32º dia de idade para os animais jovens e, para os animais adultos, a partir do 185º dia de idade.

Esta avaliação consistiu de três sessões de corrida em dias alternados. Os animais foram expostos, em cada uma das sessões, ao aparato da esteira elétrica desligada por cinco minutos. A seguir, a esteira era ligada e a velocidade gradativamente aumentada até alcançar dez metros por minuto. A partir deste momento, a cada três minutos, a velocidade era aumentada em um metro por minuto até a fadiga do animal. Considerou-se como fatigado, o animal que permanecia imóvel sobre a grade de estimulação elétrica por dez segundos consecutivos ou por três períodos de dois segundos ao longo de um minuto. Nestas situações, o animal era retirado da esteira, sendo registrados o tempo de corrida e a velocidade alcançada em cada uma das três sessões de avaliação (Hussain et al., 2001).

Para o cálculo do trabalho realizado utilizou-se a fórmula  $W = p.t.v.\text{sen}15^\circ$ , onde:  $W$  = trabalho em Kg.m;  $p$  = peso corporal no dia da sessão de avaliação, em Kg;  $t$  = tempo em minutos;  $v$  = velocidade em m/min;  $\text{sen}$  = seno de  $15^\circ$  referente à inclinação da esteira (Brooks & White, 1978). A Tabela 1 mostra dados obtidos durante a terceira sessão de avaliação de desempenho de um rato controle jovem.

**Tabela 3 – Exemplo de avaliação de desempenho de rato jovem**

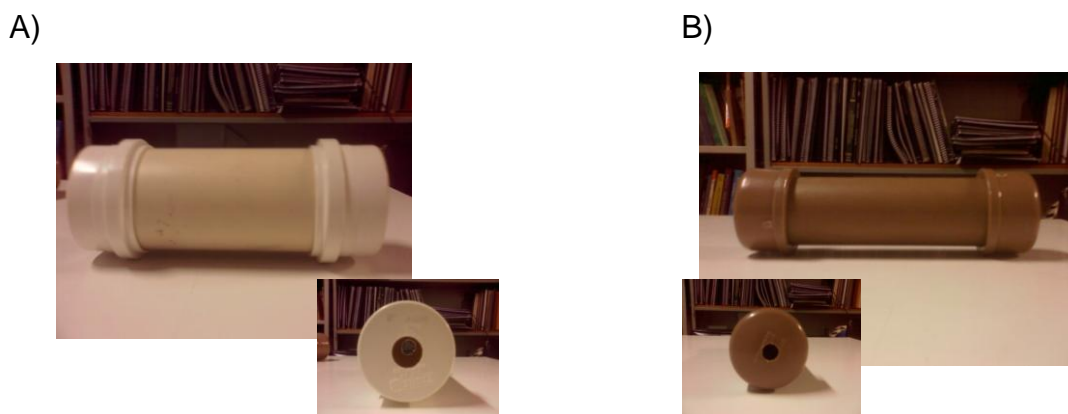
Peso (Kg)	Tempos parcial e total de exercício (min)	Velocidade da esteira (m/min)	Sen 15º	Trabalho ( $\bar{W}$ ) parcial e total (Kg.m)
0,112	3	10	0,2588	0,869568
0,112	3 (6)	11	0,2588	0,956525 (1,826093)
0,112	3 (9)	12	0,2588	1,043482 (2,869575)
0,112	3 (12)	13	0,2588	1,130438 (4,000013)
0,112	3 (15)	14	0,2588	1,217395 (5,217408)
0,112	3 (18)	15	0,2588	1,304352 (6,52176)
0,112	3 (21)	16	0,2588	1,391309 (7,913069)
0,112	3 (24)	17	0,2588	1,478266 (9,391335)
0,112	3 (27)	18	0,2588	1,565222 (10,956557)
0,112	2 (29)	19	0,2588	1,101453 (12,05801)

### 3.3.2 Exercício Físico em Esteira

O grupo de animais exercitados foi submetido a corrida em esteira por 30 minutos, com inclinação de 15°, durante 21 dias consecutivos, com velocidade correspondente a exercício de intensidade moderada, calculada para cada animal. Para este cálculo, obteve-se o valor correspondente à média de trabalho realizado no conjunto das três sessões ( $\bar{W} = W_1 + W_2 + W_3$ ). Os valores do trabalho parcial realizado ao longo da última sessão de desempenho foram somados até o ponto correspondente a 50-60% do trabalho médio (W). Este valor corresponde a velocidade de exercício em esteira de intensidade moderada (Hussain *et al.*, 2001).

### 3.4 Estresse Agudo por Contenção

No dia seguinte à última sessão de exercício físico regular em esteira, grupos de animais controles e exercitados, jovens e adultos, foram submetidos ao estresse agudo por contenção por 120 minutos. Cada animal foi posicionado individualmente dentro de contensor confeccionado em Policloreto de Vinilo (PVC) opaco (Fig. 5). Os contensores mediam 200 mm de comprimento e 70 mm de diâmetro para animais adultos e 180 mm de comprimento e 45 mm de diâmetro para animais jovens, em conformidade com especificação da empresa *Harvard Apparatus*. Todos os tubos possuíam orifícios em suas extremidades com diâmetro de 25 mm (ratos adultos) e 15 mm (ratos jovens) para acomodação do focinho e da cauda.



**Figura 5** - Contensores utilizados para contenção de ratos Wistar adultos (A) e jovens (B).

### **3.5 Morte dos animais**

Após serem retirados do contensor, os animais foram anestesiados imediatamente ( $T_0$ ) ou após 60 minutos ( $T_{60}$ ) por administração intraperitoneal de 2,2,2 – tribromoetanol (25 mg/100g de peso corporal).

Após abertura da cavidade torácica, seccionou-se a aurícula direita para obtenção de sangue periférico, coletado em tubos Vacutainer sem aditivos. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 20 minutos e a seguir a 4°C, por 30 minutos. Para obtenção do soro, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rotações por minuto (rpm), à temperatura de 4°C, por 10 minutos em centrífuga Jouan refrigerada. O soro foi separado em alíquotas e estocado em freezer - 80°C.

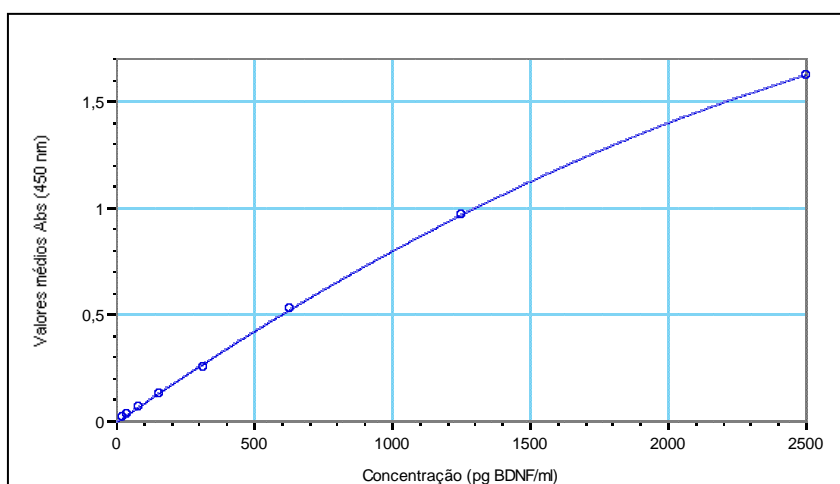
Imediatamente após colheita do sangue, procedeu-se a remoção do encéfalo e obtenção de amostras frescas do hipocampo e do cerebelo, correspondentes ao lado esquerdo. Todas as amostras foram pesadas e estocadas em freezer - 80°C.

### 3.6 Dosagem de BDNF por ELISA

Amostras de hipocampo e cerebelo foram homogeneizadas e tratadas de acordo com Bennett e cols. (1999). As amostras foram imersas em tampão de lise, contendo inibidores enzimáticos (TRIS-HCl 20 mM – pH 8, NaCl 137 mM, NP40 1%, Glicerol 10%, Aprotinina A 1mM, Pepstatina A 1 $\mu$ M, EDTA 10 mM, E-64 10  $\mu$ M, Vanadato de sódio 0,5 mM). A quantidade de tampão lise para cada amostra foi calculada a partir do seu peso fresco, na proporção de 1000 $\mu$ l de tampão lise para o 100 mg de tecido do hipocampo e 600  $\mu$ l de tampão lise para 100mg de tecido do cerebelo. Após homogeneização das amostras (Ultrasonic Processor), as mesmas foram centrifugadas e os sobrenadantes colhidos, sendo estocados em freezer –80°C até o uso.

Para a quantificação de BDNF utilizou-se o método de ELISA (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”), tipo sanduíche, utilizando kit e protocolo da R & D Systems, humano. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura (2,0  $\mu$ g/mL), diluído em tampão salina fosfato (PBS) estéril, por uma noite, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% Tween 20 e incubadas com solução de bloqueio de sítios inespecíficos contendo PBS/1% de Albumina Sérica Bovina (BSA), durante uma hora em temperatura ambiente. Após lavagem, procedeu-se a adição das amostras de tecidos ou de soro, em duplicata. Em cada placa, fez-se curva padrão da proteína quantificada (Fig. 6) e, ainda, poços sem a adição de amostras, contendo somente tampão diluente, foram também processados, para controle da técnica. Após duas horas, as placas foram incubadas, por mais duas horas, com o anticorpo de detecção biotilado (25 ng/mL), dissolvido em PBS/BSA 1% e, a seguir, com estreptavidina conjugada a peroxidase (1:200 em PBS/BSA 1%), durante 20 minutos, sob proteção da luz. A revelação foi realizada pela adição de substrato para a peroxidase, durante 20 minutos, com interrupção da reação pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. A leitura foi feita com comprimento de onda de 450 nm (VersaMax Molecular Devices). A quantidade total de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Para isto, amostras de tecidos homogeneizadas foram diluídas e distribuídas, em quadruplicatas, em placas de 96 poços e a elas foi acrescentada solução de

Azul Cromassie G-250, por 10 a 15 minutos, em temperatura ambiente, protegidas da luminosidade. Para cada placa, fez-se curva padrão com BSA. Poços somente com tampão diluente foram processados para controle de leitura inespecífica. A leitura foi realizada com comprimento de onda de 600 nm (VersaMax Molecular Devices). A concentração de BDNF no tecido foi expressa em pg de BDNF por mg de proteína total e a sérica expressa em pg de BDNF por ml de soro. Os valores obtidos foram analisados pelo programa SOFTmax Pro versão 3.1.1.



**Figura 6** - Curva de calibração para ELISA (BDNF).

### 3.7 Análise Estatística

Utilizou-se o programa GraphPad Prism versão 5.03 (GraphPad Software Incorporated) para a análise estatística. Inicialmente realizou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk test. Posteriormente, após a determinação dos dados como paramétricos, seguiu-se com aplicação do One Way Anova e para medidas repetidas para três ou mais grupos, seguido do teste de homocedasticidade ou homogeneidade da variância para determinação do coeficiente de variação (medida de dispersão que se presta para a comparação de distribuições diferentes). Devido ao coeficiente de variação entre 20% e 10% preferiu-se a utilização do pós teste Newman-Keuls para comparação múltipla, com índice de significância 5%, sendo tais dados apresentados como média  $\pm$  DP. Para a comparação de dois grupos, como amostras

independentes, para os valores de desempenho físico dos animais jovens e adultos, optou-se pelo teste *t* de Student, seguido do pós teste Mann-Whitney, com índice de significância em 5%, sendo tais dados apresentados em média  $\pm$  DP.

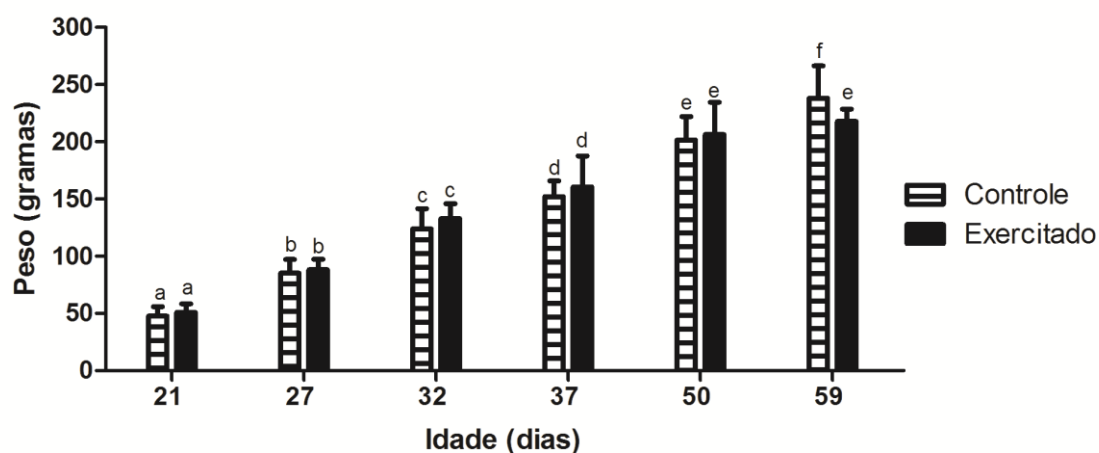
## **4 RESULTADOS**



## 4 Resultados

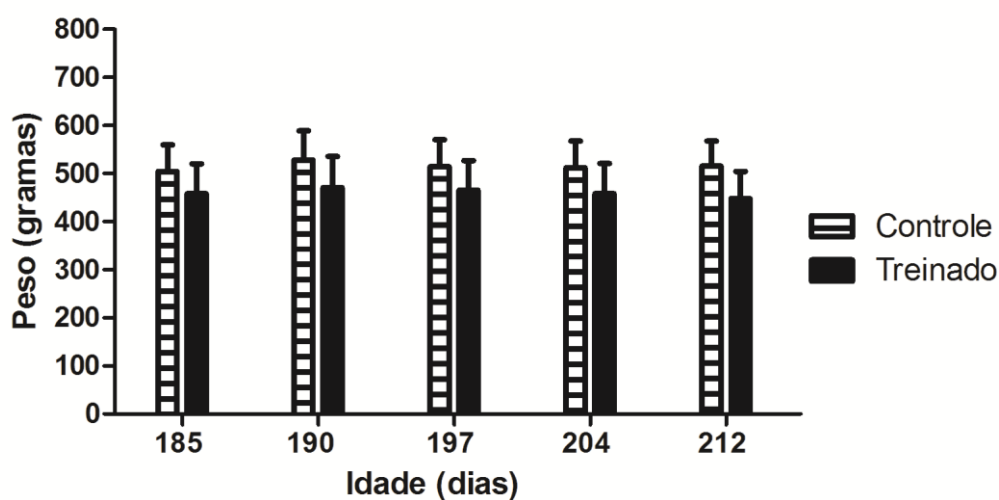
### 4.1 Peso Corporal

Os animais jovens de todos os grupos experimentais apresentaram aumento do peso corporal médio no período de 21 a 50 dias de idade. Aos 59 dias de idade apenas o grupo exercitado não apresentou aumento do peso corporal médio, em relação a idade anterior (Fig. 7).



**Figura 7:** Peso corporal médio de ratos jovens controle (n=15) e exercitados (n=14). Os dados representam média  $\pm$  DP. Letras diferentes:  $p < 0,05$  entre idades diferentes de um mesmo grupo experimental.

Em relação aos animais adultos, o peso corporal médio manteve-se semelhante no período de 185 a 212 dias de idade, em todos os grupos experimentais (Fig. 8).



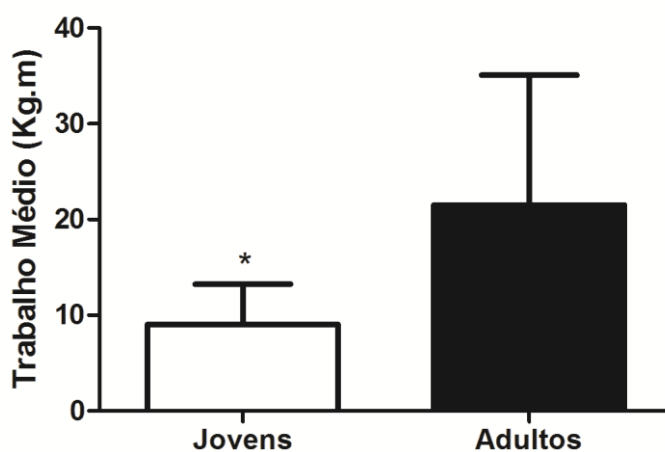
**Figura 8:** Peso corporal médio de ratos adultos controles (n=11) e exercitados (n=14). Os dados representam média  $\pm$  DP.

O Anexo 1 mostra os valores de peso corporal médio para os diferentes grupos experimentais de ratos jovens e adultos.

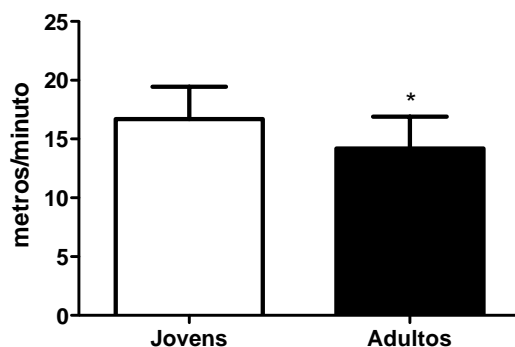
## 4.2 Desempenho em esteira

Durante a avaliação de desempenho físico do grupo jovem, os ratos permaneceram em movimento sobre a esteira durante, em média, 00:21:26 ± 00:09:16. Por sua vez, os animais adultos permaneceram em movimento na esteira, em média, por 00:15:18 ± 00:06:09.

O grupo de animais jovens desempenhou trabalho médio (9,05 ± 4,19 Kg.m) menor que o de animais adultos (21,51 ± 13,57 Kg.m), conforme mostrado na Fig. 9. Com o intuito de excluir o efeito multiplicativo do peso corporal na fórmula de trabalho médio realizado representamos, também, na Fig. 10, a velocidade de desempenho correspondente ao trabalho médio realizado. Neste caso, o grupo de animais jovens apresentou maior desempenho de corrida (16,69 ± 2,75 m/min) que o de animais adultos (14,2 ± 2,71 m/min)



**Figura 9:** Trabalho médio (Kg.m) realizado por ratos jovens (n=29) e adultos (n=25). Os dados representam média ± DP. \* p<0,05. Teste t Student.

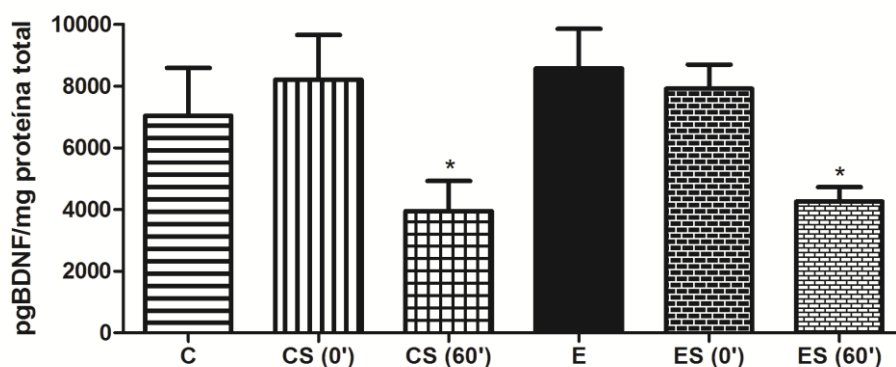


**Figura 10:** Velocidade correspondente ao trabalho médio realizado por ratos jovens (n=29) e adultos (n=25). Os dados representam média  $\pm$  DP. \*  $p < 0,05$ . Teste *t* Student.

### 4.3 Níveis de BDNF no hipocampo de animais jovens

O grupo controle de animais jovens mostrou níveis hipocámpais de BDNF ( $7039 \pm 1552$  pg/mg proteína total) semelhantes aos dos animais exercitados por três semanas em esteira ( $8574 \pm 1281$  pg/mg), como mostrado na Fig. 10.

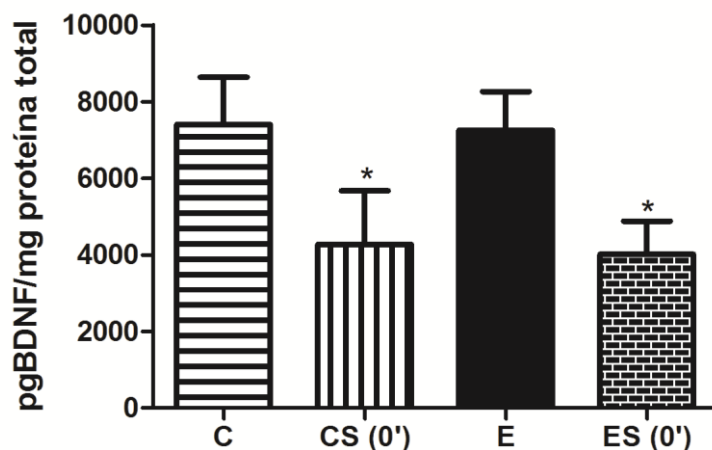
Imediatamente após o período de duas horas de estresse por contenção ( $T_0$ ) os níveis de BDNF no hipocampo de animais jovens exercitados mostrou-se semelhante ao de animais controles. Entretanto, 60 minutos após o período de duas horas de estresse por contenção ( $T_{60}$ ), os níveis de BDNF reduziram-se significativamente, tanto no grupo de animais exercitados ( $3946 \pm 973,3$ ) quanto no de controles ( $4256 \pm 467,2$ ). Dados mostrados na Fig. 11.



**Figura 11:** Níveis de BDNF (pg/ mg de proteína total) no hipocampo de ratos jovens controles (C) (n=5), controles e submetidos a estresse (CS), sacrificados imediatamente após período de estresse (CS 0') (n=5), sacrificados 60 minutos após o período de estresse (CS 60') (n=5), exercitados (E) (n=4), exercitados e submetidos a estresse por contenção (ES), sacrificados imediatamente após período de estresse (ES 0') (n=5), sacrificados 60 minutos após o período de estresse (ES 60') (n=5). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. One-Way Anova, seguido por Newman-Keuls Multiple Comparison Test. \* $p < 0,05$ .

#### 4.4 Níveis de BDNF no hipocampo de animais adultos

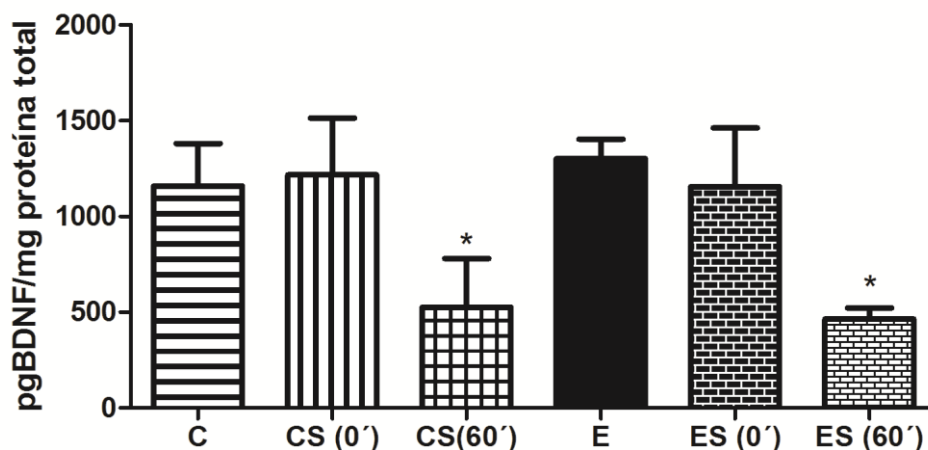
Os animais adultos controles ( $7406 \pm 1231$ ) e exercitados por 3 semanas em esteira ( $7252 \pm 1011$ ) apresentaram níveis semelhantes de BDNF no hipocampo. Os animais adultos, controles ou exercitados, mortos imediatamente após o período de duas horas de estresse por contenção, apresentaram redução significativa dos níveis de BDNF no hipocampo, respectivamente,  $4269 \pm 1403$  e  $4016 \pm 865,6$ , não havendo diferença significativa entre os dois grupos (Fig. 12).



**Figura 12:** Níveis de BDNF (pg/ mg de proteína total) no hipocampo de ratos adultos controles (C) (n=5), controles e submetidos a estresse (CS), sacrificados imediatamente após período de estresse (CS 0') (n=6), exercitados (E) (n=7), exercitados e submetidos a estresse por contenção (ES), sacrificados imediatamente após período de estresse (ES 0') (n=7). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. One-Way Anova, seguidos por Newman-Keuls Multiple Comparison Test. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.5 Níveis de BDNF no cerebelo de animais jovens

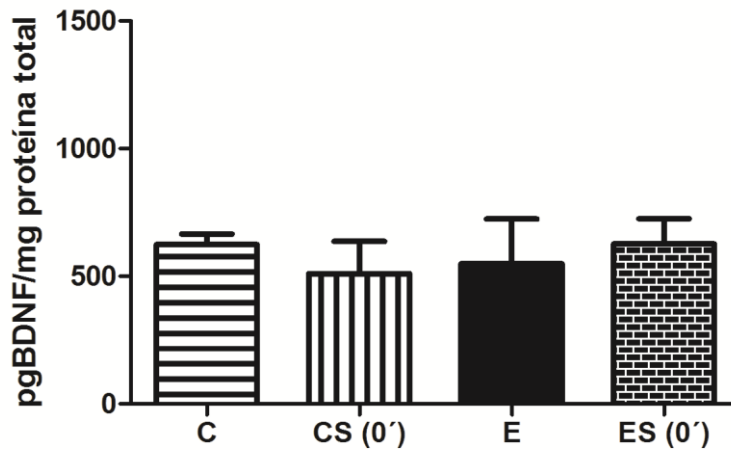
O grupo de animais jovens controles mostrou níveis cerebelares de BDNF ( $7358 \pm 1767$ ) semelhantes aos dos animais exercitados ( $7059 \pm 520,6$ ) em esteira por três semanas. O estresse de contenção pelo período de duas horas não alterou os níveis de BDNF no cerebelo dos animais jovens controles ( $6840 \pm 1532$ ) e exercitados ( $6226 \pm 1641$ ), mortos imediatamente após o estresse ( $T_0$ ). Entretanto, 60 minutos após o estresse de contenção, os níveis de BDNF reduziram-se significativamente tanto no cerebelo de animais controles ( $2194 \pm 194,1$ ) quanto no de exercitado ( $2581 \pm 719,7$ ). Estes dados estão representados na Fig. 13.



**Figura 13:** Níveis de BDNF (pg/ mg de proteína total) no cerebelo de ratos jovens controles (C) (n=5), controles e submetidos a estresse (CS), sacrificados imediatamente após período de estresse (CS 0') (n=5), sacrificados 60 minutos após o período de estresse (CS 60') (n=5), exercitados (E) (n=4), exercitados e submetidos a estresse por contenção (ES), sacrificados imediatamente após período de estresse (ES 0') (n=5), sacrificados 60 minutos após o período de estresse (ES 60') (n=5). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. One-Way Anova, seguidos por Newman-Keuls Multiple Comparison Test.\*  $p < 0,05$ .

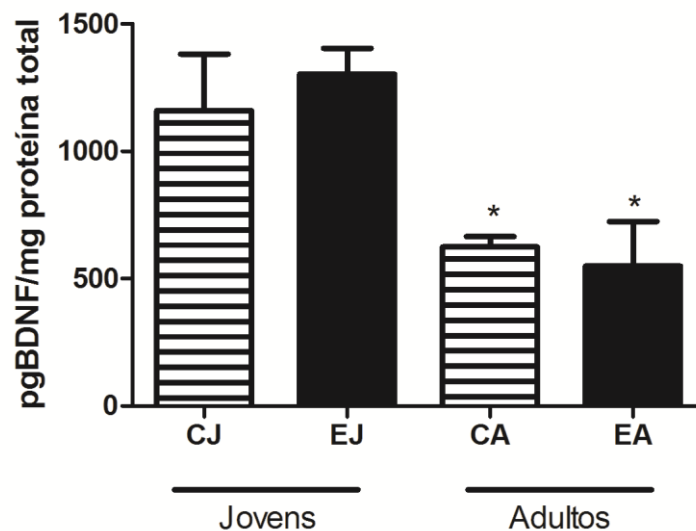
#### 4.6 Níveis de BDNF no cerebelo de animais adultos

Os níveis de BDNF no cerebelo de ratos adultos não diferiram significativamente entre os controles ( $2534 \pm 1115$ ), exercitados ( $2886 \pm 1146$ ). De modo interessante, os animais adultos mortos imediatamente após o estresse agudo por contenção, sejam controles ( $1959 \pm 641,3$ ) ou exercitados ( $2627 \pm 766,6$ ), apresentaram níveis de BDNF no cerebelo semelhantes ao de animais não submetidos ao estresse (Fig. 14).



**Figura 14:** Níveis de BDNF (pg/ mg de proteína total) no cerebelo de ratos adultos controles (C) (n=5), controles e submetidos a estresse (CS), sacrificados imediatamente após período de estresse (CS 0') (n=6), exercitados (E) (n=7), exercitados e submetidos a estresse por contenção (ES), sacrificados imediatamente após período de estresse (ES 0') (n=7). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. One-Way Anova, seguido de Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Nossos dados indicam que os níveis de BDNF no cerebelo de animais adultos são menores que o de animais jovens, tanto no grupo controle quanto no exercitado por três semanas (Fig. 15).

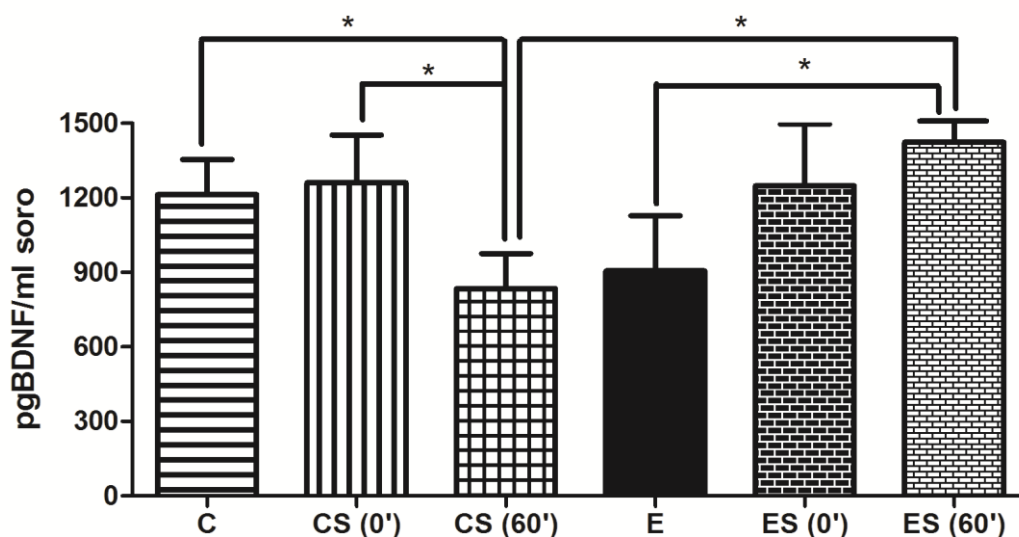


**Figura 15:** Níveis de BDNF (pg/ mg de proteína total) no cerebelo de ratos jovens controles (C, n=5) e exercitados (E, n=5) e de ratos adultos controles (C, n=5) e exercitados (E, n=7) em esteira. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. One-Way Anova, seguido de Newman-Keuls Multiple Comparison Test. \*p<0,05.

#### 4.7 Níveis séricos de BDNF em animais jovens

Os níveis séricos de BDNF mostraram-se semelhantes nos animais jovens controles ( $1213 \pm 142,2$ ) e exercitados por 3 semanas em esteira ( $906 \pm 222,7$ ). Imediatamente após o período de duas horas de estresse por contenção ( $T_0$ ), os níveis séricos de BDNF mostraram-se semelhantes nos animais controles ( $1261 \pm 191,8$ ) e exercitados em esteira ( $1248 \pm 249$ ). Estes valores são semelhantes aos de animais não submetidos ao estresse por contenção, tanto controles quanto exercitados (Fig. 16).

De modo interessante, 60 minutos após o estresse por contenção ( $T_{60}$ ), os níveis séricos de BDNF mostraram-se significativamente reduzidos nos animais controles não submetidos a exercício físico ( $834,8 \pm 140,6$ ), quando comparados com os animais exercitados em esteira e estressados ( $1424 \pm 146,2$ ). Ressaltamos que os níveis séricos de BDNF nos animais jovens exercitados e estressados ( $T_{60}$ ) mostraram-se maiores que o de animais jovens exercitados não submetidos a estresse por contenção. Por outro lado, os animais controles e submetidos a estresse por contenção ( $T_{60}$ ) mostraram níveis de BDNF menores que os de animais controles estressados  $T_0$  e controles (Fig. 15).



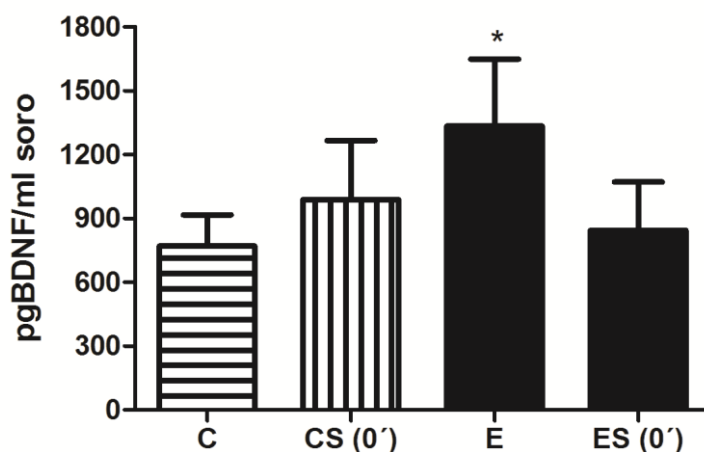
**Figura 16:** Níveis de BDNF (pg/ ml de soro) de ratos jovens controles (C) (n=5), controles e submetidos a estresse (CS), sacrificados imediatamente após período de estresse (CS 0') (n=5), sacrificados 60 minutos após o período de estresse (CS 60') (n=5), exercitados (E) (n=4), exercitados e submetidos a estresse por contenção (ES), sacrificados imediatamente após período de estresse (ES 0') (n=5), sacrificados 60 minutos após o período de estresse (ES 60') (n=5). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. One-Way Anova, seguido de Newman-Keuls Multiple Comparison Test. \* $p < 0,05$ .



#### 4.8 Níveis séricos de BDNF em animais adultos

O grupo de animais adultos exercitados em esteira por três semanas apresentou níveis séricos de BDNF maiores ( $1509 \pm 121,0$ ) que os animais adultos controles não exercitados ( $769,9 \pm 146,6$ ).

Imediatamente após o estresse por contenção ( $T_0$ ), os níveis séricos de BDNF reduziram-se nos animais submetidos a exercício em esteira ( $843,4 \pm 228,7$ ), tornando-se semelhantes aos dos grupos controle estressado ( $989,9 \pm 276,7$ ) e controle ( $769,9 \pm 146,6$ ). Estes dados estão representados na Fig. 17.



**Figura 17:** Níveis de BDNF (pg/ ml de soro) de ratos adultos controles (C) (n=5), controles e submetidos a estresse (CS), sacrificados imediatamente após período de estresse (CS 0') (n=6), exercitados (E) (n=7), exercitados e submetidos a estresse por contenção (ES), sacrificados imediatamente após período de estresse (ES 0') (n=7). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. One-Way Anova, seguido de Newman-Keuls Multiple Comparison Test. \* $p < 0,05$ .

## **5 DISCUSSÃO**

## 5 Discussão

Inicialmente abordaremos os aspectos relacionados ao modelo animal de exercício físico regular em esteira e, a seguir, os efeitos do exercício físico regular de intensidade moderada sobre a produção do BDNF em resposta ao estresse agudo de contenção em animais jovens e adultos.

O peso corporal dos animais jovens e adultos foi aferido durante todo o período experimental. Os dados mostram que tanto o grupo controle quanto o exercitado de animais jovens apresentaram ganho progressivo do peso corporal. Porém, o grupo jovem exercitado por três semanas não mostrou ganho de peso corporal na última semana de prática de exercício físico. Já os animais adultos, controle e exercitado, não apresentaram diferença no peso ao longo de todo o período experimental.

Tomanari *et al.* (2003) descreveram a curva de aquisição de peso de ratos Wistar, com acesso livre à água e ao alimento, do nascimento até os sete meses de idade. Esse estudo mostrou ganho progressivo do peso corporal somente até o segundo mês de idade, sendo que no decorrer dos meses seguintes, esse ganho desacelerou-se, gradativamente, tendendo a relativa estabilidade e atingindo um platô aos seis meses de idade.

O ganho menos expressivo de peso corporal para animais submetidos a exercício físico é descrito por Moraska *et al.* (2000) e De Bono *et al.* (2006). Segundo estes autores o exercício físico reduz o ganho de peso, pois altera favoravelmente a composição corporal, reduzindo o percentual da gordura corporal e mantendo, ou até mesmo induzindo, pequeno aumento no peso muscular relativo. O tecido muscular é metabolicamente mais ativo que o tecido adiposo, contribuindo para elevação do nível basal do metabolismo em repouso.

O protocolo utilizado em nosso laboratório para a avaliação do desempenho físico possibilitou que todos os animais fossem submetidos a exercício físico regular de intensidade semelhante, de acordo com seu desempenho físico. Nossos resultados indicam que a idade do animal é fator importante para o desempenho físico. Os animais jovens apresentaram velocidade média maior que os animais adultos durante a avaliação de desempenho.

Yano e Nagao (1995) indicam que a capacidade aeróbica e a velocidade de corrida apresentam declínio diretamente proporcional à idade dos animais. Assim, a avaliação prévia ao exercício físico regular torna-se essencial para minimizar as diferenças existentes no desempenho dos animais, permitindo o controle da intensidade do exercício físico em todos os grupos experimentais.

Os resultados referentes aos níveis teciduais de BDNF mostram que em ambos os grupos jovens e adultos, o exercício em esteira pelo período de três semanas não alterou a expressão dessa neurotrofina. A cinética de expressão de BDNF após o exercício físico regular em esteira não se encontra claramente explorada na literatura, assim como os mecanismos indutores de sua expressão.

Chen e Russo-Neustadt (2005) sugerem que a elevação de catecolaminas circulantes durante a prática do exercício possa ser a responsável pela ativação da expressão do gene para BDNF. A noradrenalina poderia ativar, via receptor acoplado à proteína G, vias de sinalização relacionadas à proteína cinase/ cAMP e CREB. Ivy *et al.* (2003) mostraram que o bloqueio da noradrenalina inibe a expressão do mRNA BDNF após a prática de exercício.

Huang *et al.* (2006) utilizaram protocolo experimental semelhante ao de nosso estudo no que se refere a período prévio de aclimação e avaliação de desempenho por consumo de O<sub>2</sub>. Nesse estudo, os ratos correram a velocidade correspondente a 70% da capacidade máxima ou consumo máximo de O<sub>2</sub>. Após quatro semanas de exercício em esteira, os níveis de BDNF no hipocampo elevaram-se significativamente em relação aos controles sedentários. Nesse caso, no entanto, o grupo controle sedentário não foi submetido ao período de aclimação e nem à avaliação de desempenho.

À semelhança dos resultados obtidos em nosso trabalho, o estudo de Cechetti *et al.* (2007) mostrou que o exercício regular em esteira (2 semanas/ 20 minutos diários) não foi capaz de alterar os níveis de BDNF no hipocampo, córtex, núcleo estriado e cerebelo. O protocolo de exercício utilizado pelos autores incluiu período de aclimação e avaliação prévia. O grupo exercitado foi comparado a um grupo denominado sedentário, por serem animais não submetidos ao período de avaliação e aclimação.

Por outro lado, Berchtold *et al.* (2005) mostraram que indução do BDNF no hipocampo pela atividade física em roda de corrida é robusta e de longa duração. Estes autores mostraram também que a experiência de exercício físico aumenta a prontidão para uma resposta futura de indução de secreção de BDNF. Em seu estudo, os autores descrevem o retorno aos níveis basais de BDNF após 14 dias de inatividade.

Soya *et al.* (2007) avaliaram a expressão de BDNF para diferentes intensidades de exercício em esteira (15 m/min e 25 m/min), sendo que a esteira encontrava-se sem inclinação, diferentemente do nosso estudo, onde a mesma apresenta inclinação de 15 graus. Os autores utilizaram ratos Wistar com 77 dias de idade, sendo exercitados após período prévio de aclimação (4-5 dias). Os resultados mostraram haver aumento na expressão do RNAm e da proteína BDNF apenas para o exercício em esteira na intensidade de 15m/min. Já para a intensidade de 25 m/min observou aumento da expressão do RNAm, porém com redução da expressão da proteína BDNF.

Os nossos achados mostram que o estresse agudo por contenção diminui os níveis hipocampais de BDNF, independentemente da realização de exercício físico prévio em esteira. Porém, os animais jovens exibiram maior resistência ao estresse agudo por contenção, pois a redução dessa neurotrofina ocorreu apenas sessenta minutos após o período de estresse. Já os animais adultos exibiram diminuição significativa dos níveis de BDNF imediatamente após o estresse agudo por contenção. Poucos estudos têm analisado a resposta de animais jovens e adultos ao estresse agudo, em especial quando associado ao exercício prévio em esteira.

O hipocampo apresenta alta densidade de receptores glicocorticóides, tornando-se particularmente sensível aos efeitos do estresse (Basak *et al.*, 2009). O número de receptores corticosteróides aumenta substancialmente com a idade, podendo-se explicar assim uma maior vulnerabilidade aos efeitos diretos dos corticosteróides com o avançar da idade, na região hipocampal. O papel dos corticosteróides na regulação da neurogênese hipocampal adulta é complexa, porém sabidamente controlada via expressão do seu receptor (Garcia *et al.*, 2004). Toth *et al.* (2008) utilizaram um modelo intermitente de estresse crônico, com duração de quatro semanas, para avaliar o efeito do estresse em diferentes idades. Os resultados demonstraram que o estresse foi

capaz de diminuir a neurogênese hipocampal e níveis de BDNF para os animais adultos, porém aumentou tanto a neurogênese quanto os níveis de BDNF nos animais jovens. Isso demonstra uma possível resistência relativa dos ratos jovens ao estresse, independentemente dos níveis de corticosterona, contrariando os achados de Garcia *et al.* (2004).

Ao contrário, Li *et al.* (2009) demonstraram que após a exposição ao estresse, a partir de uma avaliação comportamental, os ratos adultos demonstraram menor sensibilidade ao estresse quando comparados aos ratos jovens. Em relação a expressão do BDNF, mostrou-se significativamente menor nas regiões hipocampais de ambos os grupos etários. Como se pode observar, ainda não existe um consenso quanto a resposta na expressão do BDNF, em diferentes idades, para situações experimentais diversas.

Os nossos resultados referentes ao cerebelo mostram diminuição dos níveis de BDNF em animais jovens submetidos ao estresse agudo de contenção, independentemente do exercício físico prévio. A redução dos níveis cerebelares de BDNF ocorreu apenas sessenta minutos após o período de estresse agudo. Já para os animais adultos não se observou diferença significativa entre os grupos experimentais, ou seja, o estresse por contenção não reduziu os níveis de BDNF neste órgão.

Em relação a expressão do BDNF no cerebelo, os grupos controle e exercitado de animais adultos apresentaram expressão significativamente menor, quando comparados aos grupos jovens controle e exercitado. Das *et al.* 48 (2001) examinaram os níveis de RNAm BDNF no hipocampo, neocórtex e cerebelo de ratos no período pós-natal 1, 7, 14, 21 e 92 dias de idade. Os achados descreveram que a expressão de BDNF embora aumente progressivamente com a maturação do animal, principalmente no hipocampo e cerebelo, demonstram diminuição de sua expressão com o avançar da idade.

O BDNF apresenta altos níveis de expressão nas regiões do córtex, hipocampo e cerebelo, sendo o seu receptor TrkB também amplamente expresso no córtex cerebral, hipocampo, região do giro denteado, região dos neurônios ganglionares e de Purkinje cerebelares (Klintsova *et al.*, 2004).

Alguns autores descrevem que o BDNF encontrado no cerebelo pode ser produzido por neurônios locais ou transportados retrogradamente através de axônios das células de Purkinje ou, ainda, via anterógrada através das

fibras trepadeiras e paralelas (Neveu e Arenas, 1996; Schwartz *et al.*, 1997). A primeira possibilidade parece ser a mais provável, com base na conhecida localização do BDNF e seu receptor TrkB no cerebelo (Friedman *et al.*, 1998).

Além de seu papel bem reconhecido como coordenador da função motora, o cerebelo tem um papel descrito nas funções corticais superiores, podendo levar a implicações importantes no desenvolvimento de distúrbios neuropsiquiátricos, como o autismo e esquizofrenia (Fatemi *et al.*, 2008).

Em relação aos valores séricos de BDNF obtidos em nosso estudo, os resultados para os animais jovens controles mostraram-se semelhantes aos descritos para a região hipocampal e cerebelar. Porém, de modo interessante, 60 minutos após o estresse por contenção ( $T_{60}$ ), os níveis séricos de BDNF mostraram-se significativamente reduzidos nos animais controles não submetidos a exercício físico, quando comparados com os animais exercitados em esteira e estressados. Ressaltamos que os níveis séricos de BDNF nos animais jovens exercitados e estressados ( $T_{60}$ ) mostraram-se maiores que o de animais jovens exercitados não submetidos a estresse por contenção.

Em contrapartida aos resultados vistos para o hipocampo e cerebelo, o grupo de animais adultos exercitados em esteira por três semanas apresentou níveis séricos de BDNF maiores que o grupo controle não exercitados. De modo interessante, a expressão sérica de BDNF em humanos, apresenta um papel importante na sinalização em depressão e ansiedade, sendo demonstrado que a diminuição nos níveis de BDNF está correlacionada com comportamentos depressivos induzida pelo estresse (Hellweg *et al.* 2007).

O trabalho desenvolvido nesta dissertação permitirá a realização de outros projetos abrangendo exercícios físicos e fatores neurotróficos, ampliando conhecimentos sobre a cinética da expressão do BDNF. Como perspectivas futuras deste estudo, propõe-se investigar os níveis de corticosterona nos grupos estudados, assim como explorar a contribuição relativa de diferentes órgãos, seja do sistema nervoso central ou periférico ou de órgãos periféricos, em especial músculos e glândula salivar, para os níveis circulantes de BDNF.

## **6 CONCLUSÕES**



## 6 Conclusões

A partir dos resultados obtidos em nosso estudo com ratos Wistar jovens e adultos, submetidos a exercício físico regular prévio à estresse agudo de contenção, podemos concluir que:

- O protocolo de três semanas de exercício físico, em intensidade moderada, não foi capaz de alterar os níveis de BDNF no hipocampo e cerebelo, tanto para os animais jovens, quanto para os adultos;
- Os grupos jovens e adultos submetidos ao estresse agudo de contenção mostraram diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo, independentemente ao exercício físico prévio;
- Os animais jovens apresentaram redução dos níveis hipocampais e cerebelares de BDNF 60 minutos após estresse agudo por contenção, independentemente de terem se exercitado em esteira pelo período de três semanas;
- Os animais adultos não mostraram alteração nos níveis cerebelares de BDNF imediatamente após estresse por contenção, em qualquer dos grupos experimentais;
- Os animais jovens exercitados e estressados mostraram maiores valores para os níveis séricos de BDNF em relação aos animais exercitados e em relação aos controles estressados;
- Os animais adultos exercitados apresentaram níveis séricos de BDNF maiores que os controles, controles estressados e exercitados estressados.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7 Referências bibliográficas

Adlard, P.A., Cotman, C.W. 2004. Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience*. 124: 985-992.

Alberch, J., Perez-Navarro, E., Canals, J. M.. 2002. Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res Bull*. 57:817-22.

Alboni, S., Tascetta, F., Corsini, D., Benatti, C., Caggia, F., Capone, G., Barden, N., Blom, J., Brunello, N. 2011. Stress induces altered CRE/CREB pathway activity and BDNF expression in the hippocampus of glucocorticoid receptor-impaired mice. *Neuropharma*. 60 :1337-1346.

Bale, T.L., Picetti, R., Contarino, A., Koob, G.F., Vale, W.W., Kuo-Fen, L. 2002. Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1(CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *J. Neurosci*. 22:193-199.

Barde, Y.A, Edgar, D, Thoenen, H. 1982. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo. J*. 5:549-53.

Bazak, N., Kozlovsky, N., Kaplan, Z., Matar, M., Golan, H., Zohar, J., Richter-Levin, G., Cohen, H. 2009. Pre-pubertal stress exposure affects adult behavioral response in association with changes in circulating corticosterona and brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuro*. 34:844–858.

Behan, D.P., Heinrichs, S.C., Troncoso, J.C., Liu, X-J., Kawas, C.H., Ling, N., De Souza, E.B. 1995. Displacement of corticotropin releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Nature*. 378:284–287.

Berchtold, N.C., Chinn, G., Chou, M., Kessler, J.P., Cotman, C.W. 2005. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 133:853-61.

Bloss, E.B., Janssen, W.G., McEwen, B.S., Morrison, J.H. 2010. Interactive effects of stress and aging on structural plasticity in the prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 30: 6726-6731.

Borella, M.P., Sacchelli, T. 2009. Os efeitos da prática de atividades motoras sobre a neuroplasticidade. *Rev Neurocienc.* 17: 161-9.

Brooks, G.A., and T.P. White. 1978. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *J Appl Physiol.* 45:1009-15.

Cannon, W. 1940. The Adrenal Medulla. *Bull New York Acad. Med.* 16: 3-13.

Calabrese, F., Molteni, R., Racagni, G., Riva, M. A. 2009. Neuronal plasticity: A link between stress and mood disorders. *Psychoneuroendo.* 34: 208-16.

Caspersen, C.J., Powell, K.E., Christensen, G.M. 1985. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 100:126-31.

Chan, J. P., Cordeira, J., Calderon, G. A., Iyer, L. K., Rios, M. 2008. Depletion of central BDNF in mice impedes terminal differentiation of new granule neurons in the adult hippocampus. *Mol. Cell Neurosci.* 39, 372–383.

Chen, M.J., Russo-Neustadt, A.A. 2005. Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Brain Res* 135:181–193.

Cechetti F, Fochesatto C, Scopel D, Nardin P, Goncalves CA, Netto CA, Siqueira IR. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain Research*. 2008;1188:182–188.

Chiaretti, A., L. Aloe, A. Antonelli, A. Ruggiero, M. Piastra, R. Riccardi, G. Tamburrini, and C. Di Rocco. 2004. Neurotrophic factor expression in childhood low-grade astrocytomas and ependymomas. *Childs Nerv Syst*. 20:412-9.

Choi, D.C., Evanson, N.K., Furay, A.R., Ulrich-Lai, Y.M., Ostrander, M.M., Herman, J.P. 2008. The anteroventral bed nucleus of the stria terminalis differentially regulates hypothalamic-pituitary - adrenocortical axis responses to acute and chronic stress. *Endocrinol*. 149: 818–826.

Choudhury, B.K., Shi, X.Z., Sarna, S.K. 2009. Norepinephrine mediates the transcriptional effects of heterotypic chronic stress on colonic motor function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 296: 238–47.

Chrousos, G.P, Gold, P.W. 1998. A healthy body in a healthy mind—and vice versa—the damaging power of “uncontrollable” stress. *J Clin Endocrinol Metab*. 83:1842–5.

Churchill, J.D., Galvez, R., Colcombe, S., Swain, R. A., Kramer, A.F., Greenough, W.T. 2002. Exercise, experience and the aging brain. *Neurobiol Aging*. 23:941-55.

Cohen, S., Levi-Montalcini, R. 1956. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 42:571–74.

Cohen S. 2008. Origins of growth factors: NGF and EGF. *J. Biol. Chem*. 283:33793–97.

Contarteze, R., Machado, V., Gobatto, F.B. 2007. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *A Mol. Integr. Physiol.* 151:415–422.

Cotman, C.W., N.C. Berchtold. 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25:295-301.

Das, R., Chao, S., White, L., Haines, W., Harry, G., Tilson, H., Barone, S. 2001. Differential patterns of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNA and protein levels in developing regions of rat brain. *Neurosci.* 103: 739–761.

De Bono, J.P., Adlam, D., Paterson, D.J., Channon, K.M. 2006. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290:926-34.

Del Arco, A., Segovia, G., Blas, M., Garrido, P. 2010. Prefrontal cortex, caloric restriction and stress during aging: Studies on dopamine and acetylcholine release, BDNF and working memory. *Behavioural Brain Research.* 216:136–145.

Dronjak, S., Gavrilovic, L., Filipovic, D., Radojicic, M.B. 2004. Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiology and Behavior.* 81:409–415.

Duman, R.S, Monteggia, L.M. 2006. A neurotrophic model for stress related mood disorders. *Biol Psychiat* 59: 1116–1127.

Ferris, L.T., Willians, J.S., Shen, C.L. 2007. The effect to acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. *Med.Sci.Sports Exerc.* 4:728-34.

Fatemi, S.H., Reutiman, T.J., Folsom, T.D., Sidwell, R.W. 2008. The role of cerebellar genes in pathology of autism and schizophrenia. *Cerebellum* 7: 279–294.

Fuchikami, M., Morinobu, S., Kurata, A., Yamamoto, S., Yamawaki, S. 2009. Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol.* 12:73-82.

Friedman, W., Black, I., Kaplan, D. 1998. Distribution of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/ 5 in the postnatal brain: an immunocytochemical study, *Neuroscience.* 84: 101– 114.

Garcia, A., Steiner, B., Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Kempermann, G. 2004. Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell.* 3:363–371.

Glavin, G. B., Paré, W. P., Sandbak, T., Bakke, H.K., Murison, R. 1994. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 18: 223–249.

Ghiglieri, V., Sgobio, C., Patassini, S., Bagetta, V., Fejtova, A., Giampa, Marinucci, S., Heyden, A., Gundelfinger, E. D., Fusco F., Calabresi, P., Picconi, B. 2010. TrkB/BDNF-Dependent Striatal Plasticity and Behavior in a Genetic Model of Epilepsy: Modulation by Valproic Acid. *Neuropsychophar.* 35: 1531–1540.

Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R.R., Molteni, R., Edgerton, V.R. 2002. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol.* 88:2187-95.

Habib K.E., Weld K.P., Rice K.C., Pushkas J., Champoux M., Listwak S., Webster E.L., Atkinson A.J., Schulkin J., Contoreggi C., Chrousos G.P., McCann S.M., Suomi S.J., Higley J.D., Gold P.W. 2000. Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 6079–6084.

Hallbook, F., Wilson, K., Thorndyke, M., Olinski, R. P. 2006. Formation and evolution of the chordate neurotrophin and Trk receptor genes. *Brain Behav. Evol.* 68: 133–144.

Harris, G. W. 1950. Hypothalamo - Hypophysial connexions in the cetacean. *J. Physiol.* III, 361-367.

Hayes, K., Sprague, S., Guo, M., Davis, W., Friedman, A., Kumar, A., Jimenez, D.F., Ding, Y. 2008. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol.* 115, 289–296.

Huang, A. M., Jen, C. J., Chen, H. F., Yu, L., Kuo, Y. M., Chen, H. I. 2006. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neural Transm.* 113: 803–811.

Hutchinson, K.J., Gomez-Pinilla, F., Crowe, M.J., Ying, Z., Basso, D.M. 2004. Three exercise paradigms differentially improve sensory recovery after spinal cord contusion in rats. *Brain* 127:1403–14.

Ivy, A.S., Rodriguez, F.G., Garcia, C., Chen, M.J., Russo-Neustadt, A.A. 2003. Noradrenergic and serotonergic blockade inhibits BDNF mRNA activation following exercise and antidepressant. *Pharmacol Biochem Behavior* 75: 81–88.

Joëls, M., Baram, T.Z. 2009. The neuro-symphony of stress. *Nat Neurosci Rev* 10:459–466.



Karege, F., Perret, G., Bondolfi, G., Schwald, M., Bertschy, G., Aubry, J-M. 2002. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 109: 143–148.

Keim, K. L., Sigg, E. B. 1976. Physiological and biochemical concomitants of restraint stress in rats. *Pharmac. Biochem. Behav.* 4: 289-297.

Kim, M.W., Bang, M.S., Han, T.R., Ko, Y.J., Yoon, B.W. 2005. Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res* 1052: 16–21.

Kimoto, H., Eto, R., Abe, M., Kato, H., Araki, T. 2009. Alterations of Glial Cells in the Mouse Hippocampus During Postnatal Development. *Cell Mol Neurobiol.* 29: 1181–1189.

Kitamura, T., Mishina, M., and H. Sugiyama. 2003. Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Neurosci Res.* 47:55-63.

Klintsova, A.Y., Dickson, E., Yoshida, R., Greenough, W.T. 2004. Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise. *Brain Res.* 1028:92-104.

Korte, S.M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. 2001. *Neurosci. Biobehav.* 25:117-42.

Krabbe, K.S., Nielsen, A.R., Krogh-Madsen, R., Plomgaard, P., Rasmussen, P., Erikstrup, C., Fischer, C.P., Lindegaard, B., Petersen, A.M., Taudorf, S., Secher, N.H., Pilegaard, H., Bruunsgaard, H., Pedersen, B.K. 2007. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and type 2 diabetes. *Diabetologia* 50: 431–438.

Lawson, A., Ahima, R.S., Krozowski, Z., Harlan, R.E., 1992. Postnatal development of corticosteroid receptor immunoreactivity in the rat cerebellum and brain stem. *Neuroendocrinology* 55, 695–707.

Lee, T., Saruta, J., Sasaguri, K., Sato, S. and Tsukinoki, K. 2008. Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression. *Brain Res.* 1195; 43–49.

Li, Y., Ji, Y.J., Jiang, H., Liu, D.X., Zhang, Q., Fan, S.J., Pan, F. 2009. Effects of unpredictable chronic stress on behavior and brain-derived neurotrophic factor expression in CA3 subfield and dentate gyrus of the hippocampus in different aged rats. *Chin Med J.* 122:1564–1569.

Llorente, R., Gallardo, M.L., Berzal, A.L., Prada, C., Garcia-Segura, L.M., Viveros, M.P. 2009. Early maternal deprivation in rats induces gender-dependent effects on developing hippocampal and cerebellar cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 233-241.

Lou, S.J., Liu, J.Y., Chang, H., Chen, P.J. 2008. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. *Brain Res.* 1210:48–55.

Lucini, D., Riva, S., Pizzinelli, P., Pagani, M. 2007. Stress management at the worksite: reversal of symptoms profile and cardiovascular dysregulation. *Hypertension.* 49:291-297.

Lupien S. J., McEwen B. S., Gunnar M. R., Heim C. 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 434–445.

Maggio, N., Segal, M. 2009. Differential modulation of long-term depression by acute stress in the rat dorsal and ventral hippocampus. *J Neurosci* 29: 8633-8638.

Martinowich, K., Manji, H., Lu, B. 2007. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nature Neurosci.* 10:1089–1093.

Mattson, M.P., Maudsley, S., Martin, B. 2004. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 27: 589–594.

McEwen, B.S., Lasley, E. N. O fim do estresse como nós o conhecemos. Rio de Janeiro. Editora Nova Fronteira. 2003. 267 p.

Ministério da Saúde. Diretrizes e recomendações para o cuidado integral de doenças crônicas não degenerativas. 2008. 72 p.

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

Molteni, R., Calabrese, F., Cattaneo, A., Mancini, M., Gennarelli, M., Racagni, G., Riva, M.A. 2009. Acute stress responsiveness of the neurotrophin BDNF in the rat hippocampus is modulated by chronic treatment with the antidepressant duloxetine. *Neuropsychopharmacology.* 34: 1523-1532.

Moraes, R.C. Papel da corticosterona na vigência do estresse sobre a função pineal em ratos. São Paulo: USP. (Tese de Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. 2010.

Moraska A, Deak T, Spencer RL, Roth D, and Fleshner M. 2000. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279: 1321–1329.

Murakami, S., Imbe, H., Morikawa, Y., Kubo, C., Senba, E. 2005. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly. *Neurosci Res* 53:129 –139.

Murer, M.G., Yan, Q., Raisman-Vozari, R. 2001. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 63: 71–124

Neeper, S.A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., Cotman, C.W. 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res.* 726: 49–56.

Neveu, I., Arenas, E. 1996. Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats in vivo, *J. Cell Biol.* 133: 631– 646.

Organização Mundial da Saúde, 2010. World health statistics 2010. WHO Press, Geneva, Switzerland.

Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I.J., Goldstein, D.S. 1998. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: A test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol* 275:1247-1255.

Pacák, K, Palkovits, M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Rev Endocr.* 22: 502- 48.

Palma, B.D., Tiba, P.A., Machado, R.B., Tufik, S., Suchecki, D. 2007 Repercussões imunológicas dos distúrbios do sono: o eixo hipotálamo pituitária-adrenal como fator modulador. *Bras Psiquiatr.* 29:33-8.

Papez, J.W. 1927. A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol Psychiatry.* 38:725-74.

Ploughman, M., Granter-Button, S., Chernenko, G., Attwood, Z., Tucker, B.A., Mearow, K.M., Corbett, D. 2007. Exercise intensity influences the

temporal profile of growth factors involved in neuronal plasticity following focal ischemia. *Brain Res.* 1150:207-16.

Price, R.D., Milne, S.A., Sharkey, J., Matsuoka, N. 2007. Advances in small molecules promoting neurotrophic function. *Pharm. Ther.* 115: 292–306.

Putnam, K.A., Pizzagalli, D. A., Gooding, D. C., Kalin, N. H., Davidson, R. J. 2008. Neural activity and diurnal variation of cortisol: evidence from brain electrical tomography analysis and relevance to anhedonia. *Psychophysiology.* 45:886-895.

Radak, Z., Toldy A., Szabo, S. Siamilis, C. Nyakas, G. Silye, J. Jakus, and S. Goto. 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int.* 49:387-92.

Reyes, B.A., Valentino, R.J., Van Bockstaele, E.J. 2008. Stress-induced intracellular trafficking of corticotropin-releasing factor receptors in rat locus coeruleus neurons. *Endocrinology.* 149:122-130.

Rose, C.R., Blum, R., Pichler, B., Leoier, A., Kafitz, K.W., Konnerth, A. 2003. Truncated TrkB-T1 mediates neurotrophin-evoked calcium signaling in glial cells. *Nature* 426:74–78.

Sapolsky, R. M. 1985. Mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: increased neuronal vulnerability to metabolic insults. *J. Neurosci.* 5:1227-1231.

Schutter, D.J., Van Honk, J. 2009. The cerebellum in emotion regulation: a repetitive transcranial magnetic stimulation study. *Cerebellum* 8:28–34.

Schwartz, P., Borghesani, P., Levy, R., Pomeroy, S., Segal, R. 1997. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF  $\_/\_$  mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning, *Neuron* 19:269–281.

Sei, H., Saitoh, D., Yamamoto, K., Morita, K., Morita, Y. 2000. Differential effect of short-term REM sleep deprivation on NGF and BDNF protein levels in the rat brain. *Brain Research* 877:387–90.

Selye, H. 1936. A Syndrome Produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature* 138:32.

Selye, H. 1954. Interactions between systemic and local stress. *Br Med J*. 4872: 1167-1170.

Smith, G.W., Aubry, J.M., Dellu, F., Contarino, A., Bilezikjian, L.M., Gold, L.H., Chen, R., Marchuk, Y., Hauser, C., Bentley, C.A., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W., Lee, K.F. 1998 Corticotropin-releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron*. 20:1093–110.

Smith, M.A., Cizza, G. 1996. Stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression are attenuated in aged Fischer 344/N rats. *Neurobiol Aging* 17: 859 – 864.

Soya H, Nakamura T, Deocaris CC, Kimpara A, Imura M, Fujikawa T, Chang H, McEwen BS, Nishijima T. 2007. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 358:961–967.

Sterlemann, V., Rammes, G., Wolf, M., Liebl, C., Ganey, K., Müller, M.B., Schmidt, M.V. 2009. Chronic social stress during adolescence induces cognitive impairment in aged mice. *Hippocampus*. Epub.

Skaper, S.D., Walsh, F.S. 1998. Neurotrophic molecules: strategies for designing effective therapeutic molecules in neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci*. 12:179-93.

Stone, A.A., Schwartz, J., Smyth, J., Kirschbaum, C., Cohen, S., Hellhammer, D., Grossman, S. 2001. Individual differences in the diurnal cycle of salivary free cortisol: A replication of flattened cycles for some individuals. *Psychoneuroendocrinology*, 26: 295–306.

Tillerson, J.L., Caudle, W.N., Reveron, M.E., Miller, G.W. 2003. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 119:899-911.

Tsigos, C., Chrousos, G.P. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.*, 53:865-871.

Tognoli, C., Rossi, F., Di Cola, F., Baj, G., Tongiorgi, E., Terova, G., Saroglia, M., Bernardini, G., Gornati, R. 2010. Acute stress alters transcript expression pattern and reduces processing of proBDNF to mature BDNF in *Dicentrarchus labrax*. *BMC Neurosci* 11:465-475

Tomanari, G. Y., Pine, A. S., Silva, M. T. A. 2003. Ratos wistar sob regimes rotineiros de restrição hídrica e alimentar. *Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva*. 5: 57-71.

Tong, L., Shen, H., Perreau, V.M., Balazs, R., Cotman, C.W. 2001. Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiol Dis*. 8:1046-1056.

Toth, E., Gersner, R., Wilf-Yarkoni, A., Raizel, H., Dar, D.E., Richter-Levin, G., Levit, O., Zangen, A. 2008. Age-dependent effects of chronic stress on brain plasticity and depressive behavior. *J Neurochem*. 107:522-532.

Ueyama, T., Kawai, Y., Nemoto, K., Sekimoto, M., Tone, S., Senba, E. 1997. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neurosci. Res*. 28:103–10.

Ulrich-Lai, Y.M., Herman, J.P. 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat. Rev. Neurosci.* 10:397–409.

Vaynman, S., Gomez-Pinilla, F. 2005. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. *Neurorehabil Neural Repair.* 19:283-95.

Vaynman, S.S., Z. Ying, D. Yin, and F. Gomez-Pinilla. 2006. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res.* 1070:124-30.

Wang, Y., Wang, W., Tan, Q., Xia, B., Dou, K. 2008. Different Roles of BDNF, KDR and Bax in Liver Response to Acute or Repeated Immobilization Stress: Evidence from Quantified Reverse. *Journal of US-China Medical Science.* 5: 10-18.

Weik, U., Herforth, A., Kolb-Bachofen, V., Deinzer, R. 2008. Acute stress induces proinflammatory signaling at chronic inflammation sites. *Psychosomatic Medicine.* 70:906–912.

West, A.E., Chen, W.G., Dalve, M.B., Dolmetsch, R.E., Kornhauser, J.M., Shaywitz, A.J., Takasu, M.A., Tao, X., Greenberg, M.E. 2001. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11024–11031

Willner, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. 2005. *Neuropsychobiology.* 52:90-110.

Woolley, C., Gould, E., McEwen, B.,S. 1990. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 531:225-231.



Zheng, H., Liu, Y., Li, W., Yang, B., Chen, D., Wang, X., Jiang, Z., Wang, H., Wang, Z., Cornelisson, G., Halberg, F. 2006. Beneficial effects of exercise and its molecular mechanisms on depression in rats. *Behav Brain Res.* 168:47-55.

Yano, H., Nagao, N. 1995. Decline in maximal oxygen uptake on work performance in rats during the developmental phase. *Jpn J Physiol.* 45:889-93.

Ying, Z., Roy, R.R., Edgerton, V.R, Gomez-Pinilla, F. 2005. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 193:411-9.

Yuen, E.Y., Liu, W., Karatsoreos, I.N., Ren, Y., Feng, J., McEwen, B.S., Yan, Z. 2011. Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. *Mol Psychiatry.* 16, 156–170.

Young, D., Lawlor, P.A., Leone, P., Dragunow, M., During, M. J. 1999. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat Med.* 5:448-53.



### Anexo 1

Peso médio (g  $\pm$  dp) de ratos Wistar jovens e adultos controles e submetidos a exercício físico em esteira por 3 semanas

	Idade (dias)					
<b>Ratos Jovens</b>	<b>21</b>	<b>27</b>	<b>32</b>	<b>37</b>	<b>42</b>	<b>59</b>
Controle	47,53 $\pm$ 8,433	85,01 $\pm$ 12,09	123,9 $\pm$ 17,68	152,1 $\pm$ 13,76	201,6 $\pm$ 20,52	238,2 $\pm$ 28,23
Exercitado	50,77 $\pm$ 7,501	88,09 $\pm$ 9,260	132,8 $\pm$ 13,05	160,5 $\pm$ 27,23	206,4 $\pm$ 28,19	217,8 $\pm$ 10,89
<b>Ratos Adultos</b>	<b>185</b>	<b>190</b>	<b>197</b>	<b>204</b>	<b>212</b>	<b>-</b>
Controle	504,0 $\pm$ 55,98	528,4 $\pm$ 60,87	514,3 $\pm$ 56,19	512,3 $\pm$ 55,36	515,6 $\pm$ 52,09	-
Exercitado	458,0 $\pm$ 62,14	471,3 $\pm$ 64,20	465,9 $\pm$ 61,41	458,5 $\pm$ 62,42	448,3 $\pm$ 56,28	-