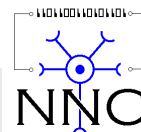


Luciana Estefani Drumond de Carvalho



**SINALIZAÇÃO E HOMEOSTASE DO CÁLCIO HIPOCAMPAL MODULADAS PELO
EXERCÍCIO FÍSICO: IMPLICAÇÕES NOS PROCESSOS DE MEMÓRIA E
NEUROPROTEÇÃO**

Belo Horizonte/2011

Luciana Estefani Drumond de Carvalho

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**SINALIZAÇÃO E HOMEOSTASE DO CÁLCIO HIPOCAMPAL MODULADAS
PELO EXERCÍCIO FÍSICO: IMPLICAÇÕES NOS PROCESSOS DE MEMÓRIA
E NEUROPROTEÇÃO**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. André Ricardo Massensini

**Belo Horizonte, MG
2011**

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Interface Cérebro Máquina - INCeMaq

Dedico este trabalho

a meus amados filhos e marido.

*Pela certeza de que a vida vale a pena.
Pela certeza de que esta realização me
torna uma pessoa melhor para vocês.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por reservar à minha vida momentos e pessoas tão especiais. Por me dar paciência quando necessário e força sempre.

Ao meu orientador professor André Massensini pela importante orientação e contribuição para o meu desenvolvimento científico. Por ter compreendido minhas decisões pessoais e apoiado as decisões científicas. Obrigada por tudo!

Ao Professor Márcio Moraes pelas valiosas e entusiasmadas discussões científicas. Por mostrar-me que fazer pesquisa não é fácil, mas é incrivelmente apaixonante.

À Professora Grace Schenatto por sua total disponibilidade, pelos muitos ensinamentos e pela amizade. Você sempre foi um grande exemplo.

À Professora Juliana Tavares pelo apoio e amizade.

Aos grandes amigos e colaboradores da equipe primavera: Flávio pela força inicial. Talita pela grande ajuda e diversão garantida durante os experimentos intermináveis. E especialmente ao Hércules pelas ricas discussões, por estar ao meu lado, incansavelmente, em TODOS os experimentos. Por me fazer enxergar uma luz nos momentos em que o cansaço me consumia e pela alegria, carinho e confiança. A união faz a força!

Aos colaboradores: Patrícia Guidine, Marcelo Limborço, Danielle Bernardes e Renata Abreu, pelas boas idéias e pelo empenho na realização dos experimentos.

Às amigas especiais: Patrícia, Maira e Dani por todo carinho e cumplicidade nesta caminhada.

A todos os amigos do NNC: Aninha, Danielle, Marcelo, Leandro, Daniel, Brisa, Onésia, Gustavo R., Tupete, Thiago, Natália, Iva, João, Gustavo L., Renata, Gabriel, Lockman, Cristina, Aíla, Dr. José Maurício, Mauro, Isabella, Cristiane...
Pela convivência agradável, alegre e enriquecedora.

Aos professores Dr. Tasso Moraes, Dr. Dawidson Assis, Dr. Robison Santos, Dra. Maria de Fátima, Dra. Cristina Guatimosin, Dra. Janice Silva e Dr. Jader Cruz pela utilização de equipamentos, doação e empréstimo de drogas e reagentes.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética (UNICAMP) Vinícius, Edilene e em especial ao Prof. Dr. Roger Castilho pelos ensinamentos sobre o mundo das mitocôndrias e por todo esforço em me auxiliar na realização dos experimentos.

Ao Taquinho pelo apoio técnico.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa para o desenvolvimento dessa tese.

À Mariele e Suelem, pela amizade sincera, por enxugarem minhas lágrimas por tantas vezes, pelas risadas, pelos segredos compartilhados e por terem me ensinado a importância do agora. Sinto muita falta de vocês.

Aos meus pais, José e Lucia, pelos exemplos, pela presença alegre, pelo apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida.

À minha irmã, meu sobrinho, toda minha família e amigos, pelo carinho e por inúmeras vezes compreenderem minha ausência.

À Dona Vera e à Maria pelo carinho e dedicação que têm a mim e minha família. Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil.

Ao meu marido, Fabiano. Meu grande e único amor. Que conheci quando ainda era uma criança e ao lado do qual me tornei tudo o que sou. Obrigada pela paciência infinita, pelo carinho diário, por me dar a benção da maternidade. Por seguir ao meu lado nessa vida doida de quem ama fazer pesquisa.

Aos meus filhos, Matheus e Júlia, por me fazerem intensamente feliz sempre, pelos beijos melados nos dias difíceis, por me ensinarem tanto da vida em tão pouco tempo. Por me tornarem ainda mais forte e determinada. Amo muito vocês!

**“Não se acostume com o que não o faz feliz, revolte-se quando julgar necessário.
Alague seu coração de esperanças, mas não deixe que ele se afogue nelas.
Se achar que precisa voltar, volte!
Se perceber que precisa seguir, siga!
Se estiver tudo errado, comece novamente.
Se estiver tudo certo, continue ...”**

FERNANDO PESSOA

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Cálcio e Função Cerebral	5
1.2. Exercício Físico e Função Cerebral	6
1.3. Hipocampo	9
2. OBJETIVO GERAL	10
3. HIPÓTESE	11
4. METODOLOGIA GERAL	12
4.1. Animais	12
4.2. Protocolo de Treinamento	12
4.2.1. Sistema de Natação	12
4.2.2. Adaptação ao meio líquido	13
4.2.3. Teste de Esforço Máximo	13
4.2.4. Protocolo de Natação	14
4.3. Análise Estatística	14
CAPÍTULO I	16
EXERCÍCIO FÍSICO MODULANDO SINALIZAÇÃO DE Ca²⁺ E MEMÓRIA ...	16
1. Considerações iniciais	17
2. Objetivos específicos	21
3. Protocolos Experimentais	22
3.1. Efeito do exercício físico sobre os processos de memória	22
3.2. Efeito do exercício físico sobre a liberação de glutamato, dependente e independente de cálcio, em sinaptossomas hipocampais	28
3.3. Efeito do exercício físico sobre o cálcio intrasinaptossomal de neurônios hipocampais	35
3.4. Efeito do exercício físico sobre a liberação de glutamato hipocampal modulada pelo cálcio intra-sinaptossomal	41
CAPÍTULO II	46
EXERCÍCIO FÍSICO MODULANDO HOMEOSTASE DO Ca²⁺ E NEUROPROTEÇÃO	46
1. Considerações iniciais	47
2. Objetivos específicos	49
3. Protocolos experimentais	50
3.1. Neuroproteção hipocampal mediada por exercício físico	50
3.2. Efeito do exercício físico sobre a excitotoxicidade hipocampal induzida por isquemia <i>in vitro</i>	57
3.3. Efeito do exercício físico sobre a função mitocondrial hipocampal	62
3.4. Avaliação do efeito do exercício físico sobre a expressão de proteínas que compõem o PPT mitocondrial	73
6. CONCLUSÕES	79
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

8. APÊNDICE	93
8.1. Aprovação do comitê de ética.....	93
8.2. Artigo submetido.....	94
8.3. Lista de drogas, reagentes e anticorpos.....	114
8.4. Lista de equipamentos:	115

LISTA DE ABREVIATURAS

aCSF	líquido cefalorraquidiano artificial
Aga IV	ω -agatoxin IV
ANT	transportador de nucleotídeos de adenina
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca²⁺	íon cálcio
CCDV	canais de cálcio dependentes de voltagem
CRC	capacidade de retenção de cálcio
CsA	ciclosporina A
CypD	ciclofilina D
DMSO	dimetil sulfóxido
DTT	dithiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	ácido etileno glicol-bis(β -aminoetiléter)N,N,N',N'-tetraacético
EthD-1	etídio-homodímero
EXE	grupo de animais em exercício
GDH	glutamato desidrogenase
Glu	glutamato
HEPES	(N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfônico])
KCL	cloreto de potássio
KRH	Krebs-Ringer-Hepes
ME	memória espacial
MTT	brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium

MVIIC	ω - conotoxin MVIIC
NADP⁺	β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, reduzido
OD	objeto deslocado
OF	objeto familiar
OI	objeto imóvel
ON	objeto novo
PPT	poro de permeabilidade transitória mitocondrial
RO	reconhecimento de objetos
SDS	dodecil sulfato de sódio
SED	grupo de animais sedentários
SNC	sistema nervoso central
VDAC	canal aniônico dependente de voltagem
VER	veratridina

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. SISTEMA DE NATAÇÃO.	13
FIGURA 2. TAREFA DE RECONHECIMENTO DE NOVO OBJETO.....	23
FIGURA 3. TAREFA DE RECONHECIMENTO ESPACIAL DE OBJETO.	24
FIGURA 4. MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETO.	26
FIGURA 5. LIBERAÇÃO CONTÍNUA DE GLUTAMATO EM SINAPTOSSOMAS HIPOCAMPAIS. .	33
FIGURA 6. CÁLCIO INTRASINAPTOSSOMAL LIVRE (BASAL) NO HIPOCAMPO	38
FIGURA 7. ENTRADA DE CÁLCIO INTRASINAPTOSSOMAL DECORRENTE DA DESPOLARIZAÇÃO COM KCL.....	39
FIGURA 8. LIBERAÇÃO DE GLUTAMATO HIPOCAMPAL	43
FIGURA 9. EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O DANO CELULAR HIPOCAMPAL APÓS ISQUEMIA <i>IN VITRO</i>	55
FIGURA 10. EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR HIPOCAMPAL APÓS ISQUEMIA <i>IN VITRO</i>	56
FIGURA 11. EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A CONCENTRAÇÃO EXTRACELULAR DE GLUTAMATO, INDUZIDA POR ISQUEMIA <i>IN VITRO</i>	61
FIGURA 12. POTENCIAL DE MEMBRANA DAS MITOCÔNDRIAS HIPOCAMPAIS	69
FIGURA 13. CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE CÁLCIO (CRC) MITOCONDRIAL.....	70
FIGURA 14. AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DO PPT MITOCONDRIAL.	71
FIGURA 15. EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS QUE COMPÕEM O PPT MITOCONDRIAL	75

RESUMO

O cálcio (Ca^{2+}) é o mais importante e versátil mensageiro intraneuronal, regulando uma variedade de processos, tais como memória e morte celular. Este papel na sinalização é conduzido contra rígidos mecanismos homeostáticos. Neste contexto, existem evidências indicando que o exercício físico regular exerce efeito positivo no cérebro, ativando vias celulares e moleculares, que influenciam positivamente os processos de memória e morte celular, funções altamente influenciadas pela sinalização de cálcio. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a modulação do exercício físico na sinalização e homeostase do cálcio hipocampal e suas influências nos processos de memória e neuroproteção.

Ratos Wistar machos foram divididos em dois grupos: grupo exercício (EXE) e grupo sedentário (SED). O EXE foi submetido à natação 5x/semana, 30 min/dia, durante 4 semanas, suportando 60% da carga máxima tolerada no teste de esforço máximo. O SED foi levado à piscina nos mesmos tempos, porém não realizou a atividade de natação.

Testes comportamentais mostraram que a memória espacial avaliada pela tarefa de preferência ao objeto deslocado foi aumentada pelo treinamento de natação, porém não foi observada diferença na tarefa de reconhecimento de novo objeto. Além disso, utilizando a preparação de sinaptossomas hipocampais, observamos efeito do exercício físico aumentando a concentração basal e a entrada de cálcio no terminal pré-sináptico, após despolarização com KCL. Adicionalmente, quando estimulados com KCL, a liberação de glutamato foi maior nos sinaptossomas hipocampais de animais EXE, mesmo na presença de quelante de Ca^{2+} externo. No entanto, não foram observadas diferenças na liberação de glutamato dos sinaptossomas hipocampais, quando estes foram estimulados com veratridina ou quando despolarizados com KCL, na presença de quelante de Ca^{2+} interno e bloqueadores de canais para cálcio dependentes de voltagem.

O exercício físico foi capaz de induzir neuroproteção em fatias de hipocampo submetidas ao protocolo de privação de oxigênio e glicose, diminuindo o número de células mortas e preservando a viabilidade celular, com diminuição da liberação de glutamato de fatias hipocâmpais de animais do grupo exercício. Os experimentos *in vitro* demonstraram que as mitocôndrias dos animais EXE apresentam a mesma capacidade de retenção de cálcio (CRC) que os animais SED. Além disso, as mitocôndrias respondem com a mesma eficiência à ciclosporina-A (CsA), não havendo diferenças na velocidade de liberação do cálcio. Entretanto, o exercício físico exerceu efeito sobre a dinâmica de abertura do poro de permeabilidade transitória (PPT), diminuindo o período de latência. Não houve diferença na expressão da proteína ANT entre os grupos, contudo, foi observada grande diminuição na expressão de ciclofilina-D (CypD).

Portanto, o aumento da entrada de cálcio no terminal pré-sináptico e da liberação do neurotransmissor glutamato podem favorecer os processos de plasticidade sináptica, contribuindo para a melhora na memória espacial. Adicionalmente, durante o processo isquêmico, há uma diminuição da concentração extracelular de glutamato, este mecanismo favorece o controle homeostático do cálcio, diminuindo a ligação do glutamato a seus receptores e reduzindo a entrada de Ca^{2+} nos terminais pós-sinápticos. A avaliação funcional mitocondrial não revelou contribuição da capacidade de controle homeostático do Ca^{2+} por esta organela, nos efeitos benéficos promovidos pelo exercício físico. Entretanto, a alteração da dinâmica de abertura do PPT e a diminuição na expressão de CypD podem indicar retardo da liberação do cálcio e dos fatores apoptóticos mitocôndrias, favorecendo a neuroproteção.

Palavras-chaves: Cálcio, exercício, memória, neuroproteção, glutamato, mitocôndria.

ABSTRACT

Calcium is the most versatile and important intracellular messenger in neurons, regulating a variety of neuronal processes, such as memory and cell death. This role in signaling has to be conducted against rigid homeostatic mechanisms. In this context, there is evidence supporting the fact that regular exercise has beneficial effects on the brain, which activate cellular and molecular pathways that contribute to memory and neuroprotection. Thus, the purpose of this study was to evaluate the modulation of calcium signaling and calcium homeostasis in memory and neuroprotection induced by exercise.

Male Wistar rats were divided into two groups: exercise (EXE) and sedentary (SED). The EXE group was submitted to a swimming protocol 5x/week, 30 min/day for 4 weeks, with moderate training intensity (60% of maximum load). At the end of training period, animals were submitted to experimental protocols.

Memory performance evaluated by displaced object preference tasks showed that spatial short-term memory was improved by swimming training. However, no effect was observed for the novel object task.

We have used rat synaptosomes to study the effects of physical exercise on the release of glutamate and on the concentrations of free calcium ions inside the synaptosomes. The results indicate modifications of concentrations free Ca^{2+} . Additionally, glutamate release was increased in the hippocampus of animals submitted to physical activity, with possible consequences for neurotransmission.

Physical exercise was able to induce neuroprotection in hippocampal slices submitted to oxygen glucose deprivation, decreasing the number of cell death and increasing de viability in EXE , in addition to a reduced glutamate release in this group.

The *in vitro* functional mitochondria experiments demonstrated that hippocampal mitochondria from EXE group required the same levels of Ca^{2+} than those from SED group to open the PTP. In addition, these assays showed that hippocampal mitochondrias from TRE group respond to the permeability pore

transition (PPT) inhibitor, cyclosporine A (CsA) as efficiently as mitochondrias from SED group. Interestingly CypD expression in hippocampal mitochondria was slower in SED group.

In summary, our results are in accordance with the literature regarding the beneficial and neuroprotective effects of exercise, pointing to pathways that increase the mechanisms involved in the calcium-independent and -dependent glutamate release. However, the calcium retention capacity (CRC) seems do not contribute to the observed neuroprotection.

Keywords: Calcium, exercise, memory, neuroprotection, glutamate, mitochondria.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cálcio e Função Cerebral

O cálcio (Ca^{2+}) é um importante segundo mensageiro, responsável por regular uma ampla variedade de processos celulares (Clapham, 1995). A concentração deste íon livre no citosol é mantida cerca de 10.000 vezes abaixo da concentração extracelular (Marian and Dean, 1999; Nicotera and Orrenius, 1998). Este alto gradiente eletroquímico de Ca^{2+} entre os compartimentos intra e extracelulares possibilita a transdução de sinais bioquímicos ao interior das células (Carmeliet, 2004). Entre os processos celulares controlados pela sinalização de Ca^{2+} encontram-se: contração muscular, metabolismo energético, crescimento e diferenciação celular, excitose e plasticidade sináptica durante aprendizado e memória (Arundine and Tymianski, 2003).

Para possibilitar a realização de todas as suas funções celulares e evitar a citotoxicidade, o controle homeostático deste íon é bastante rígido. Existem vários mecanismos para conservar a concentração desse íon em níveis adequados, permitindo sinais temporais e espaciais de forma localizada (Arundine and Tymianski, 2003).

A remoção do cálcio do citoplasma pode ser feita através de três mecanismos. O primeiro é o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, localizado na membrana plasmática, que troca três íons Na^+ por um íon Ca^{2+} . Atua transportando o cálcio tanto para fora, como para dentro da célula, dependendo do gradiente iônico. O segundo, é através da bomba de cálcio ATPase da membrana plasmática (PMCA), que transporta o cálcio do citosol para o meio extracelular a partir da hidrólise do ATP (Nowycky and Thomas, 2002). O terceiro mecanismo é realizado por duas importantes organelas: o retículo endoplasmático e a mitocôndria. A recaptção de cálcio para o retículo endoplasmático é realizada pela Ca^{2+} ATPase do retículo sarco-endoplasmático (SERCA). Na mitocôndria, a recaptção de cálcio pode ser feita pelo uniporter mitocondrial (Collins et al., 2001).

Entretanto, além de fazer parte de vias de sinalização importantes para a função e sobrevivência da célula, o Ca^{2+} também participa de vias que sinalizam dano celular e morte. A perda da homeostase deste íon, causada pelo aumento intracelular excessivo de Ca^{2+} , como o que ocorre em uma isquemia (Arundine and Tymianski, 2003), ativa inúmeros mecanismos que contribuem para o processo de morte neuronal, tais como, crise energética e disfunção mitocondrial (Green and Reed, 1998; Nicotera and Orrenius, 1998; Nicotera and Lipton, 1999) ativação de enzimas proteolíticas, estresse oxidativo e peroxidação lipídica, aumento da atividade de endonucleases, entre outros (Dafre et al., 2003; Johansson and Belichenko, 2002).

1.2. Exercício Físico e Função Cerebral

Atividade física é definida, segundo Caspersen (1985) como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em gasto energético maior do que os níveis de repouso. O exercício é um subgrupo da atividade física que é planejado, estruturado e repetitivo (Caspersen et al., 1985).

Tradicionalmente, as pesquisas envolvendo a fisiologia do exercício se concentram nas respostas e adaptações do sistema respiratório, cardiovascular e muscular, já que muitos dos benefícios, relacionados a saúde e qualidade de vida com a prática regular de exercícios, são decorrentes de respostas e adaptações nestes três sistemas orgânicos (Dubow and Kelly, 2003). No entanto, o exercício físico exerce influência em sistemas que não estão diretamente relacionados a sua execução, tais como o sistema imune (Pedersen and Hoffman-Goetz, 2000), o trato gastrointestinal (Casey et al., 2005) e o sistema nervoso (Cotman and Berchtold, 2002).

Na última década, vários estudos têm demonstrado os benefícios do exercício sobre a saúde e funções cerebrais (Cotman and Berchtold, 2002; Hill et al., 1993; Laurin et al., 2001; Rogers et al., 1990). A participação em programas de exercício físico tem consistentemente emergido como um

indicador chave na melhora da função cognitiva (Rogers et al., 1990), aumentando a capacidade no aprendizado e memória (van Praag et al., 1999), diminuindo a incidência de demência (Laurin et al., 2001) e aumentando a resistência a dano isquêmico (Ang et al., 2003; Ding et al., 2005; Ding et al., 2006b; Endres et al., 2003; Li et al., 2004; Stummer et al., 1995).

A ação do exercício físico sobre a função cognitiva pode ser indireta ou direta. Entre os mecanismos que agem indiretamente, a diminuição da pressão arterial, decréscimo dos níveis de LDL e triglicérides no plasma sanguíneo e inibição da agregação plaquetária parecem agir melhorando as funções cerebrais e também a capacidade funcional geral, refletindo-se desta maneira no aumento da qualidade de vida (van Boxtel et al., 1997).

Além dos mecanismos indiretos, os mecanismos diretos atuam aumentando as conexões sinápticas (Pysh and Weiss, 1979) e estimulando a neurogênese (van Praag et al., 1999). Outra hipótese que tem sido formulada diz respeito aos efeitos do estresse oxidativo sobre o SNC, de modo que a prática de exercício físico aeróbio, poderia aumentar a atividade de enzimas antioxidantes de forma semelhante ao que acontece em outros tecidos, como no músculo esquelético, aumentando a capacidade de defesa contra os danos provocados por espécies reativas de oxigênio (Chodzko-Zajko and Moore, 1994; Radak et al., 2001). Fatores de crescimento, tais como da família das neurotrofinas (NT), são potenciais candidatos a mediar os efeitos benéficos do exercício sobre o SNC, pelo fato de serem importantes moduladores da sobrevivência e plasticidade neuronal (Neeper et al., 1996). Entre os fatores tróficos elevados no cérebro pelo exercício estão: fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin-like growth factor*, IGF) (Carro et al., 2001), de fibroblasto (*fibroblast growth factor 2*) (Gómez-Pinilla et al., 1997) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain derived neurotrophic factor*, BDNF) (Neeper et al., 1996). Embora outros fatores tróficos tenham importantes participações na promoção da plasticidade neuronal, o aumento de BDNF e moléculas associadas à plasticidade têm sido o foco para os efeitos do exercício no cérebro, especialmente no hipocampo, área vital relacionada ao aprendizado

e memória, bem como córtex cerebral, cerebelo e medula espinhal (Neeper et al., 1995).

Os roedores são os principais modelos animais de estudo para os paradigmas do exercício físico nas funções cerebrais e seus mecanismos. Os dois principais modelos de atividade física são: (1) atividades voluntárias, como atividades em rodas de correr (Brown and Van Huss, 1973; Pang et al., 2006; Tong et al., 2001; Zheng et al., 2006) e ambientes enriquecidos (Burghardt et al., 2004; Kempermann et al., 1997; Lewis, 2004), e (2) exercícios forçados, como esteira (Brown et al., 1979; Ploughman et al., 2005) e natação (Albeck et al., 2006; Ding et al., 2006a; Inal et al., 2001). Estes modelos geralmente visam estimular respostas a um treinamento com predominância do metabolismo aeróbico, pois este tipo de exercício está associado a benefícios à saúde em geral. O ambiente enriquecido é uma referência ao tipo padrão de gaiola, sendo uma série de diferentes estímulos aos animais, como acessos a rodas de correr, vivência em grupos e ambientes complexos contendo brinquedos, túneis, além de frequentes mudanças na localização da comida. Este estímulo ambiental é geralmente acompanhado de ganhos na função cerebral, principalmente os associados à aprendizagem e à memória (Will et al., 2004). A roda de correr é uma atividade física intermitente circadiana, voluntária, de livre acesso, que permite a corrida a uma velocidade autodeterminada (Arida et al., 2004).

A corrida em esteira ativa as respostas neuroendócrinas de estresse e obriga o animal a correr em uma velocidade constante, de acordo com as configurações de treinamento físico do experimento: tempo, duração, velocidade (Arida et al., 2004) e inclinação (Dohm et al., 2001; Lightfoot et al., 2001). As atividades forçadas obrigam os animais a realizarem o exercício físico em maiores intensidades, ou seja, maiores solicitações energéticas.

A modalidade de exercício físico utilizada neste trabalho foi a natação forçada, que permite selecionar sobrecargas de exercício através da variação de 3% a 6% da massa corporal do animal e impõe menor estresse mecânico devido ao empuxo da água, recrutando diferentes grupos musculares e reduzindo os efeitos da gravidade (Jolitha et al., 2006).

1.3. Hipocampo

O substrato neural avaliado neste trabalho foi o hipocampo, que é uma estrutura do sistema límbico situada adjacente ao córtex entorrinal e desempenha papel importante no aprendizado e memória (Horel, 1978), funções extremamente importantes para sobrevivência e de fácil observação e avaliação.

Outro fator importante considerado foi a alta vulnerabilidade deste substrato ao processo isquêmico. A isquemia cerebral global pode afetar o cérebro inteiro, induzindo a perda da pressão sanguínea e aumento da pressão intracraniana, levando a edemas cerebrais. A isquemia focal afeta partes do cérebro, podendo causar danos permanentes em neurônios específicos e regiões particulares do SNC, sugerindo uma vulnerabilidade seletiva (Lipton, 1999; Schmidt-Kastner and Freund, 1991). Vários trabalhos têm demonstrado que os neurônios diferem em sua sensibilidade ao dano isquêmico e em sua capacidade de recuperação após o insulto (Auer, 1998; Pulsinelli, 1992; Pulsinelli, 1985). Algumas áreas apresentam maior vulnerabilidade, particularmente a região CA1 do hipocampo, onde se observa a morte de quase todos os neurônios após uma breve interrupção do fluxo sanguíneos cerebral. Depois das células piramidais do hipocampo, as células mais sensíveis à isquemia são os neurônios da 3ª e 4ª camadas corticais, estriado, septo, CA3, tálamo-ótico e substância nigra (Pulsinelli, 1992; Schmidt-Kastner and Freund, 1991).

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a sinalização e a homeostase de cálcio nos circuitos hipocampais dos animais submetidos a exercício físico de natação e discutir suas implicações nos processos de memória e no fenômeno de neuroproteção.

3. HIPÓTESE

O exercício físico de natação altera a sinalização de cálcio hipocampal favorecendo a liberação do neurotransmissor glutamato e aumentando o desempenho em tarefas de memória e aprendizagem. Além disso, o treinamento de natação apresenta atividade neuroprotetora em modelo de isquemia *in vitro*, devido ao melhor controle homeostático do cálcio.

4. METODOLOGIA GERAL

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos procedentes da população geral do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO), pesando entre 150-200g. Durante as semanas de treinamento os animais foram alimentados com ração balanceada padrão (Nuvilab®) e água “*ad libitum*”, tendo a temperatura ambiente controlada (25°C), com foto período de 12 horas claro/escuro.

Todos os protocolos estão de acordo com o certificado expedido pelo Comitê em Experimentação Animal (CETEA- nº. 154/2010). Cuidados foram adotados para se evitar sofrimento desnecessário, bem como para minimizar o número de animais utilizados.

4.2. Protocolo de Treinamento

Os procedimentos do protocolo de natação foram adaptados de: (Almeida et al., 2009; Osorio et al., 2003).

4.2.1. Sistema de Natação

O sistema de natação constitui-se de quatro tanques individuais confeccionados com vidros. Cada tanque apresenta dimensões de 20cm X 20cm X 70cm, correspondendo cada um ao volume de 28 litros, totalizando assim 112 litros. A água é bombeada diretamente para um aquecedor, que mantém a temperatura em 32°C±1 (figura 1).



Figura 1. Sistema de natação. Composto por quatro baias, temperatura controlada por termostato ($32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$).

4.2.2. Adaptação ao meio líquido

Inicialmente todos os animais foram adaptados ao meio líquido. A adaptação foi composta de períodos crescentes de natação durante 4 dias, iniciando com 10 minutos no primeiro dia e terminando com 25 minutos no último dia. Este processo foi realizado na mesma piscina onde os animais foram treinados, mas sem sobrecarga.

4.2.3. Teste de Esforço Máximo

Terminado o período de adaptação, todos os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo exercício (EXE) e grupo sedentário (SED).

Com o objetivo de identificar indiretamente a capacidade física individual de cada animal, realizou-se um teste de esforço, que consistiu em um período de natação com incrementos de 1% da massa corporal a cada 3 minutos, atado junto à cauda do animal, até o momento da fadiga, que era identificada quando o

animal permanecia abaixo da superfície por mais de 10 segundos (Baker and Horvath, 1964).. Desta forma foi determinada a carga máxima suportada por cada animal. As cargas de treinamento foram confeccionadas utilizando estanho (fios de solda).

4.2.4. Protocolo de Natação

Quarenta e oito horas após o teste de esforço máximo e identificação da carga máxima tolerada, os animais do grupo exercício iniciaram o treinamento de natação. Os ratos foram treinados no decorrer de 4 semanas, 5 vezes por semana, durante 30 minutos. Cada animal realizava a atividade com 60% da carga máxima suportada durante o seu respectivo teste de esforço máximo. O grupo sedentário, no decorrer do período de exercício, foi colocado dentro da piscina sobre uma plataforma de acrílico, com profundidade da água de 5 cm, permitindo que este grupo fosse manuseado diariamente e presenciasse o mesmo ambiente do grupo exercício, porém sem realizar esforço físico.

Ambos os grupos foram pesados semanalmente, sempre no primeiro dia do reinício da nova semana de exercícios, para acompanhamento do peso corporal e correção das cargas de trabalho impostas ao grupo exercício.

Fórmula para correção semanal da carga:

$$\text{carga da semana} = \frac{\text{peso atual} \times 60\% \text{ da carga máxima suportada}}{\text{peso no dia do teste de esforço}}$$

Após 48 horas do último dia de exercício, os animais foram submetidos aos subsequentes testes e ensaios experimentais.

4.3. Análise Estatística

O programa Graph Pad Prism versão 4.0 (GraphPad Software, La Jolla California, USA) foi utilizado na análise dos dados. Para a seleção do teste estatístico adequado, avaliamos primeiramente a dispersão dos dados. Uma vez

que todos os dados obtidos apresentaram distribuição normal, foram avaliados por testes estatísticos paramétricos.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. O teste específico à análise de cada dado está descrito nos resultados e nas legendas.

CAPÍTULO I

EXERCÍCIO FÍSICO MODULANDO SINALIZAÇÃO DE Ca^{+2} E MEMÓRIA

1. Considerações iniciais

Memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações. As memórias podem ser classificadas segundo sua duração, em memória de trabalho (MT) ou de curtíssima duração, memória de curta duração (MCD) e memória de longa duração (MLD); e quanto ao seu conteúdo em memória implícita e memória explícita (Izquierdo et al., 2002).

As memórias explícitas, também chamadas de memórias declarativas, são as memórias que registram fatos, eventos ou conhecimentos. É possível declarar conscientemente que elas existem e relatar como as adquirimos, já que são adquiridas com plena intervenção da consciência. São divididas em memórias episódicas e semânticas. As memórias episódicas são as mais afetadas nas doenças neurodegenerativas, e se referem a eventos aos quais assistimos ou participamos (Danion et al., 2001). As memórias semânticas são de conhecimentos gerais (Izquierdo et al., 2002). As principais estruturas nervosas responsáveis pelas memórias explícitas do tipo episódica são o hipocampo e o córtex entorrinal, tais regiões trabalham associadas e em comunicação com outras regiões do córtex, como o córtex cingulado e o córtex parietal (Izquierdo et al., 1998).

Memória e aprendizado resultam de alterações na representação neural, através de eventos plásticos que modificam a comunicação entre neurônios (Heeb, 1949).

Os neurônios, ou células nervosas, constituintes do sistema nervoso são responsáveis pelos sinais transmitidos de um ponto a outro, virtualmente sem alteração. Quando um sinal passa de um neurônio a outro, ele precisa atravessar um espaço que é chamado de fenda sináptica. Em muitos casos, a transmissão através da fenda sináptica é efetuada pela liberação de um composto químico chamado de neurotransmissor. Quando um impulso chega ao terminal nervoso, ele dispara a liberação do neurotransmissor, que pode atravessar pela fenda sináptica e estimular ou inibir a próxima célula, carregando ou não o impulso adiante. Este processo é denominado de transmissão sináptica neuroquímica (Dunant and Israel, 1985).

Em resumo, a transmissão sináptica neuroquímica possui componentes pré-sinápticos e pós-sinápticos. No lado pré-sináptico, neurotransmissores e outras substâncias são sintetizados e armazenados em vesículas sinápticas. Quando um potencial de ação atinge a terminação nervosa, a membrana plasmática pré-sináptica se despolariza e os canais para cálcio voltagem-dependentes se abrem na zona ativa. O aumento no cálcio intracelular leva a exocitose de vesículas sinápticas, resultando na liberação de neurotransmissores (Sudhof and Jahn, 1991).

As vesículas sinápticas captam e estocam neurotransmissores, e se fundem com outras membranas, principalmente a membrana pré-sináptica, no processo de exocitose. Estas funções podem ser executadas por proteínas de vesículas sinápticas. As proteínas de vesículas sinápticas podem ser divididas em duas classes que correspondem às duas funções das vesículas. A primeira classe consiste de proteínas de transporte, assim como canais e bombas necessárias para a captação e estocagem de neurotransmissores. A segunda classe consiste de proteínas envolvidas no tráfego e nas reações de fusão-fissão da membrana vesicular (Sudhof and Jahn, 1991).

Nos últimos anos, as proteínas presentes na membrana das vesículas sinápticas têm sido intensamente estudadas, levando a identificação e caracterização destas proteínas que incluem, em adição à bomba de prótons, as sinaptofisinas (Knaus et al., 1990; Südhof et al., 1987), as sinaptotagaminas (Geppert et al., 1991; Perin et al., 1990; Wendland et al., 1991), as sinaptobrevinas (VAMP) (Elferink et al., 1989; Trimble et al., 1988), as sinapsinas (Sudhof et al., 1989) as rab proteínas (Fischer von Mollard et al., 1990; Ngsee et al., 1990) e a SV2 (Buckley and Kelly, 1985; Feany et al., 1992).

As vesículas sinápticas se movem para a zona ativa em preparação para a exocitose e retornam dela após a endocitose. O terminal nervoso está carregado com uma rede de microfilamentos e microtúbulos (Hirokawa et al., 1989). As vesículas sinápticas podem utilizar este citoesqueleto para trafegar até a zona ativa. As sinapsinas ligam-se a membrana e aos elementos do citoesqueleto, ambas interações sendo reguladas por fosforilação, o que sugere que elas

formem a ligação entre as vesículas e os filamentos (De Camilli et al., 1990). As sinaptofisinas parecem estar envolvidas na formação de um canal de fusão entre as membranas plasmática e vesicular (Betz, 1990) e/ou podem funcionar como um organizador para a interação com outras proteínas de vesícula. Algumas evidências sugerem que sinaptotagminas atuam como sensores de Ca^{2+} modulando a liberação de neurotransmissores (Scheller, 1995).

Terminada a exocitose, a captação de neurotransmissores para o interior de vesículas sinápticas é dirigida por um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana da vesícula sináptica. O gradiente de prótons é dependente de ATP (Parsons and Koenigsberger, 1980), onde uma H^+ -ATPase presente na membrana vesicular bombeia os íons H^+ para o interior da vesícula (Yamagata and Parsons, 1989). Quando o meio se torna ácido, ocorre a troca dos íons H^+ pelas moléculas do neurotransmissor (Bahr and Parsons, 1992).

O Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC, foi pela primeira vez identificado na década de 60, sendo o mais abundante aminoácido no cérebro (Curtis and Watkins, 1961). Este neurotransmissor é sintetizado no sistema nervoso através do ciclo de Krebs e pela transaminação do α -cetoglutarato, ou diretamente a partir da glutamina. A glutamina é sintetizada em células gliais a partir do glutamato recaptado, transportada para o terminal sináptico e convertida novamente em glutamato, pela enzima glutaminase. Outras enzimas também participam deste processo, como a glutamina sintetase e a ornitina. Uma vez no terminal sináptico, o glutamato é armazenado em vesículas ou mantido livre no citoplasma (Bradford et al., 1978; Fonnum, 1984; Nedergaard et al., 2002).

No terminal nervoso, após exercer seu papel de neurotransmissor, o L-glutamato pode ter três destinos: ser re-captado para o terminal pré-sináptico, ser captado para o terminal pós-sináptico ou para as células da glia. Esse processo de captação do glutamato é de fundamental importância, pois o glutamato não é degradado na fenda sináptica. Assim sendo, serão os mecanismos de captação e difusão, os responsáveis por promover o término da ação desse neurotransmissor (Bellocchio et al., 2000; Takamori et al., 2000).

Após ser recaptado o glutamato presente no citoplasma pode ser transportado para o interior das vesículas sinápticas, para ser liberado durante a excitação e reiniciar o ciclo. O transportador que carrega o glutamato para dentro da vesícula sináptica VGLUT1 (transportador vesicular de glutamato) tem propriedades muito diferentes dos outros transportadores de glutamato. Ele funciona através de um gradiente de próton, gerado pela H⁺-ATPase vesicular, localizada na membrana vesicular que carrega H⁺ para o interior das vesículas. Na ausência de ATP e Mg⁺⁺, a bomba para de funcionar e o glutamato poderá “vazar” da vesícula pela reversão do transportador (Bellocchio et al., 2000; Takamori et al., 2000).

Alterações na maquinaria e na função pré-sináptica, descritas acima, podem modular a neurotransmissão alterando os processos de memória. O mecanismo utilizado para o armazenamento de memórias em seres vivos ainda não é completamente conhecido. Estudos indicam que a potenciação de longa duração (LTP, do inglês Long Term Potentiation), descrita pela primeira vez em 1973 por Bliss e Lomo, é uma boa candidata para explicar o mecanismo celular e molecular do processo de memória (Bliss and Lomo, 1973). A LTP é definida como um aumento na eficiência (força) sináptica (Malenka, 1999). Existe um debate entre os pesquisadores, que discutem se o aumento da força sináptica ocorre através de mecanismos pré-sinápticos e/ou por mecanismos pós-sinápticos. Nicoll (2003) sugere que esta discussão existe porque a LTP nos diferentes tipos de sinapses pode ter mecanismos diferentes e que os mecanismos não são excluídos (Nicoll, 2003).

A potenciação sináptica pode ocorrer devido à: (1) alterações nos mecanismos pré-sinápticos que resultam no aumento dos níveis de glutamato na fenda sináptica, (2) modificações pós-sinápticas tais como, o aumento no número dos receptores ou alterações funcionais dos mesmos, (3) alterações extrasinápticas, como a diminuição na recaptação de glutamato pelas células gliais, levando ao aumento na disponibilidade deste neurotransmissor para os seus receptores e (4) modificações estruturais (Bliss and Collingridge, 1993).

2. Objetivos específicos

- Comparar o desempenho em tarefas de reconhecimento espacial de objeto e de novo objeto, entre os animais submetidos ao exercício físico e os animais sedentários;
- Avaliar a liberação de glutamato, dependente e independente de cálcio, em sinaptossomas hipocampais, utilizando-se KCl e veratridina como agentes despolarizantes da membrana;
- Investigar o efeito do exercício físico sobre a concentração basal e a entrada de cálcio sinaptossomal em hipocampo, utilizando-se despolarização por KCl;
- Avaliar a influência da modulação do cálcio pré-sináptico na liberação de glutamato hipocampal de animais submetidos a exercício físico, utilizando-se bloqueadores de canais para cálcio dependentes de voltagem e agentes quelantes de cálcio.

3. Protocolos Experimentais

3.1. Efeito do exercício físico sobre os processos de memória

Vários estudos demonstram efeitos favoráveis do exercício físico em testes de memória, a maior parte utiliza o treinamento voluntário em roda de correr ou o exercício forçado em esteira.

Avaliando memória espacial através da tarefa de labirinto aquático de Morris, foi observado melhora no desempenho de animais que realizaram exercício voluntário em roda de correr e exercício forçado em esteira (Grace et al., 2009). Adicionalmente existe aumento no desempenho de tarefa de reconhecimento de novo objeto em animais que realizaram exercício voluntário em roda de correr (Grace et al., 2009).

Poucas investigações são realizadas utilizando-se o exercício forçado de natação, mas animais que praticaram natação também se beneficiam, apresentando melhora na tarefa de esquivas inibitória (Radak et al., 2006) e também na tarefa de campo aberto (Toldy et al., 2009).

Hipótese: O exercício físico de natação de 4 semanas modula positivamente os processos de memória do tipo episódica.

Metodologia:

Tarefas de reconhecimento de objetos - RO

Usando variações da tarefa de RO, avaliamos diferentes tipos de memórias de objetos (do tipo episódica): a memória de reconhecimento de objeto novo e a memória espacial (ME) de objeto (Eacott and Norman, 2004; Hannesson et al., 2004).

As tarefas são compostas por três etapas: adaptação, treino e teste. Para a realização das tarefas foi utilizada uma caixa de acrílico preta com medidas 70cm X 70cm X 40cm, que foi limpa criteriosamente com álcool 70% entre as

sessões. Os objetos apresentados aos animais como estímulo eram feitos de peças plásticas de encaixar (Gulliver, SP, Brasil) e variavam em forma, cor e tamanho; eram fixados ao piso da caixa para não se moverem durante os testes. Os procedimentos experimentais foram realizados por um experimentador cego às condições experimentais dos animais.

Adaptação – foi permitido ao animal 20min de livre exploração da caixa vazia, 24h antes da sessão de treino.

Sessão de treino - O animal foi exposto a dois objetos idênticos durante 5 min.

• **Memória de reconhecimento do novo objeto**

Sessão de teste – 1h após o treino, o animal foi colocado na caixa contendo um objeto familiar (OF) e outro objeto novo (ON) (figura 2).

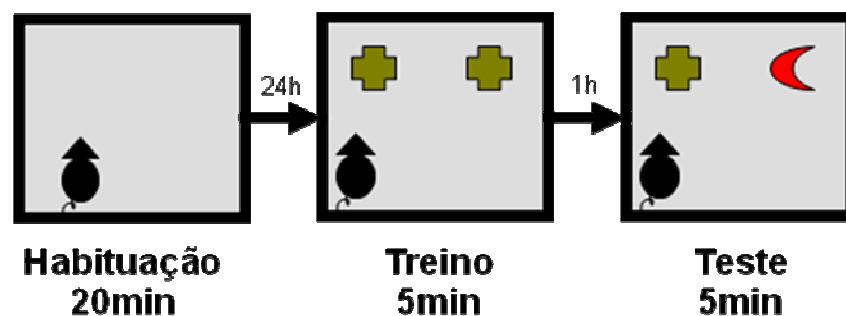


Figura 2. Tarefa de reconhecimento de novo objeto. Composto por 3 etapas: habituação, treino e teste.

• **Memória da localização espacial de objeto**

Sessão de teste – Após o intervalo de 1 hora, o animal foi exposto aos mesmos objetos apresentados no treino, porém um deles foi colocado numa localização espacial diferente, o objeto deslocado (OD) (figura 3).

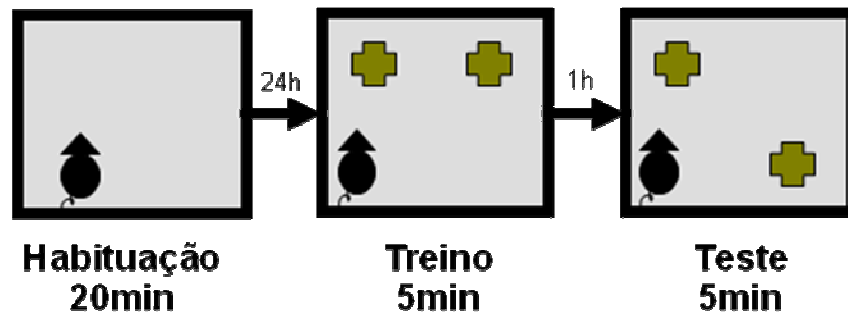


Figura 3. Tarefa de reconhecimento espacial de objeto. Composto por 3 etapas: habituação, treino e teste.

Os resultados foram expressos em média±EPM do Índice de Reconhecimento (IR):

$$IR = \frac{\text{Tempo de exploração do objeto novo ou do objeto na localização espacial nova (s)}}{\text{Tempo total de exploração dos dois objetos (s)}}$$

O IR pode alcançar valores no intervalo de 0 até 1,0. Um IR igual a 0,5 indica que o tempo de exploração aos dois objetos foi o mesmo e um IR significativamente maior que 0,5 indica que houve uma maior exploração do objeto novo ou do objeto na localização espacial nova, ou seja, exploraram este objeto mais do que 50% do tempo total de exploração e, portanto, apresentam a memória de RO intacta.

O comportamento de exploração foi definido quando o animal aproximou o focinho a uma distância de aproximadamente 2 cm do objeto. Qualquer outro comportamento não foi considerado exploratório.

Resultados: Não houve diferença entre os grupos de animais sedentários (SED) e exercício (EXE), no tempo total de exploração, durante a fase de treino da tarefa de reconhecimento espacial (SED= 9,9±1,9s; EXE=10,3±2,3s; $p>0,05$ teste *t* de Student). Além disso, o teste estatístico one-sample confirma que a performance na fase de teste de ambos os grupos [SED,

$t(15) = 13,15$, $p < 0,0001$, e EXE, $t(17) = 8,18$, $p < 0,0001$] foi diferente da chance (50% do tempo). Entretanto, conforme representado pela figura 4A, os grupos exploraram o objeto deslocado (OD) e o objeto imóvel (OI) de forma diferente. O teste *t de Student* revelou efeito do exercício ($p = 0,02$), apresentando maior índice de reconhecimento para o EXE ($0,67 \pm 0,01$) quando comparado ao SED ($0,62 \pm 0,01$).

O teste one-sample para o índice de reconhecimento de novo objeto confirma que a performance na fase de teste de ambos os grupos [SED, $t(13) = 5,13$; $p < 0,0001$, e EXE, $t(13) = 9,16$; $p < 0,0001$] foi diferente da chance (50% do tempo). No entanto, diferindo do resultado encontrado no teste de memória espacial, não foi observada diferença na preferência de exploração ao novo objeto entre o SED ($0,62 \pm 0,02$) e EXE ($0,66 \pm 0,01$), teste *t de Student* $p > 0,05$ (figura 4B).

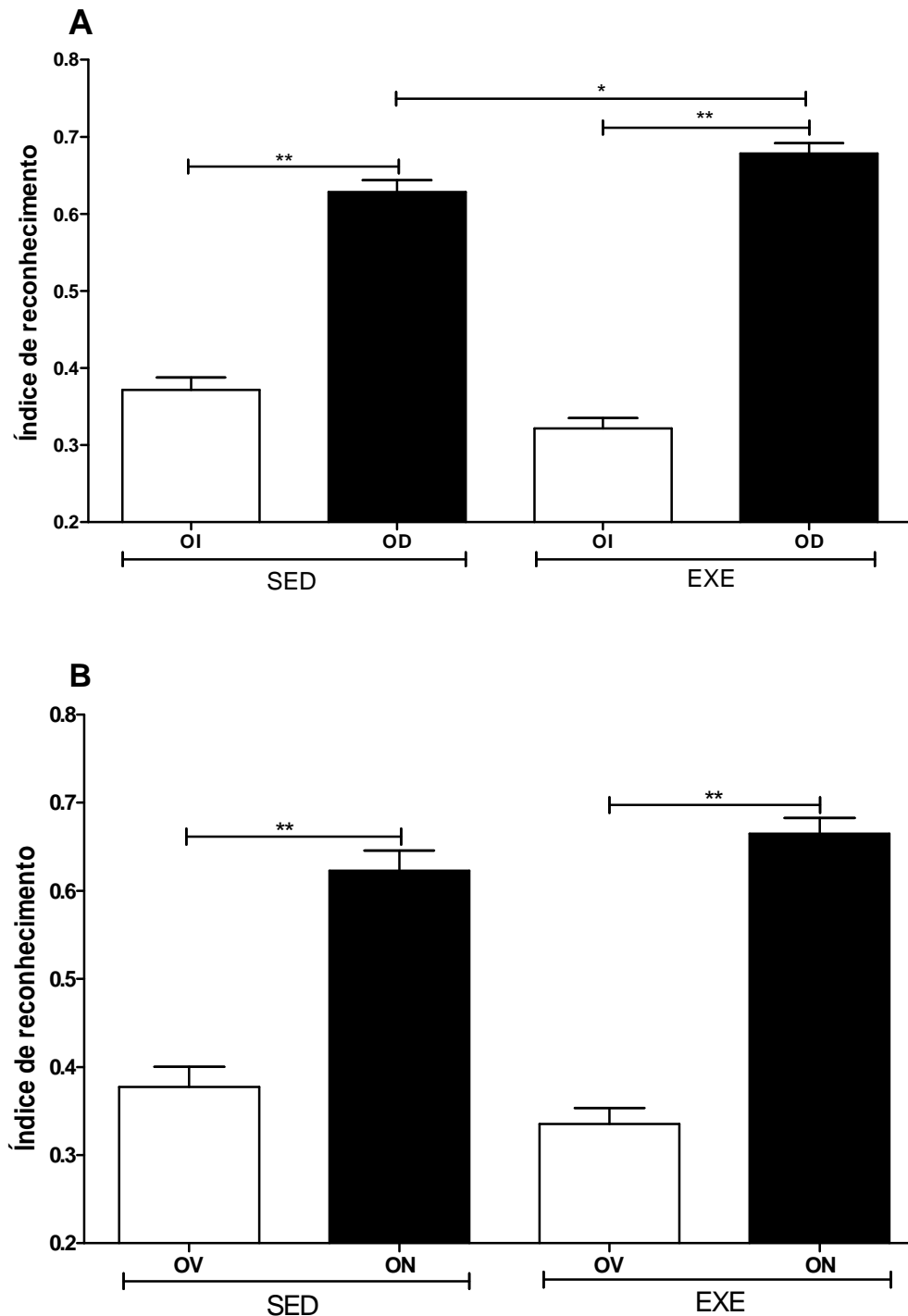


Figura 4. Memória de reconhecimento de objeto. Os dados estão representados como média±EPM do índice de reconhecimento da fase de teste **(A) Reconhecimento espacial de objeto.** Objeto que permaneceu imóvel (OI) e outro que foi deslocado (OD). SED OI=0,37±0,01 e OD=0,62±0,01 (n=16). EXE OI=0,32±0,01 e OD=0,67±0,01 (n=18) **(B) Reconhecimento de novo objeto.** Mesmo objeto ou objeto velho (OV) e o objeto novo (ON). SED OV=0,37±0,02 e ON=0,62±0,02 (n=14). EXE OV=0,33±0,01 e ON=0,66±0,01 (n=14). Teste *t* de student * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Discussão parcial:

Uma tarefa refinada, bastante utilizada para avaliar os efeitos do exercício físico sobre a memória é o “Labirinto Aquático de Morris” (*Morris's Water Maze*). Nesta tarefa de reconhecimento espacial, o animal desloca-se através de natação, em um grande tanque de água, na tentativa de localizar uma plataforma para se proteger (Albeck et al., 2006; Ang et al., 2006; O'Callaghan et al., 2007; van Praag et al., 1999). Entretanto, esta metodologia não é a mais adequada para o protocolo de treinamento utilizado, pois a maior habilidade no meio aquático dos animais treinados em natação poderia comprometer a avaliação cognitiva.

Outra forma de investigar o processamento de uma memória do tipo episódica em animais seria através da tarefa de RO. Em roedores, esta tarefa foi descrita por Ennaceur e Delacour (Ennaceur and Delacour, 1988) como um teste de memória baseado na exploração diferencial de um objeto familiar e outro não familiar através do comportamento espontâneo.

Nesta tarefa, uma atividade exploratória diferenciada entre os grupos pode levar a conclusão equivocada em relação à capacidade cognitiva dos grupos experimentais. A fim de excluir esta possibilidade, foi avaliado o tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de treino. Esta avaliação demonstrou que os dois grupos apresentam capacidade exploratória similar, pois passaram tempos semelhantes explorando os objetos na fase de treino.

Os nossos resultados indicam que os animais do grupo sedentário e do grupo exercício apresentam capacidade intacta nos processos de aprendizagem e memória de ambas as tarefas, pois passaram mais tempo explorando o novo objeto ou o objeto que foi deslocado na fase de teste (figura 4). Entretanto o nosso modelo de atividade física de natação (30min/dia, 5x/semana por 4 semanas) aumentou o desempenho da tarefa de reconhecimento espacial de objetos (os animais passaram mais tempo explorando o objeto deslocado), porém não foi observada diferença na tarefa de reconhecimento de novo objeto quando comparados os dois grupos. Outros estudos desenvolvidos pelo nosso

grupo de pesquisa mostraram o mesmo fenômeno quando os animais foram treinados durante 8 semanas.

Estes dados corroboram a literatura que descreve aumento da memória espacial nos animais submetidos a exercício físico voluntário em roda de correr (Grace et al., 2009) e em esteira (Mello et al., 2008). Devido ao fato da ausência de efeito do exercício na memória de novo objeto, é provável que o protocolo executado atue sobre mecanismos responsáveis pela memória em substratos específicos para a realização da tarefa de reconhecimento espacial. O córtex pré-frontal, entorrinal, perirrinal e região CA1 hipocampal são cruciais para o reconhecimento de novidade em testes com objetos ou contextos. O hipocampo está envolvido, principalmente, com o aprendizado espacial, portanto, a tarefa de memória espacial de objetos envolve, principalmente, circuitos hipocampais (Dere et al., 2007; Steckler et al., 1998).

3.2. Efeito do exercício físico sobre a liberação de glutamato, dependente e independente de cálcio, em sinaptossomas hipocampais

O exercício físico é capaz de potenciar os efeitos plásticos hipocampais no protocolo de indução de LTP, conhecido como mecanismo celular e molecular dos processos de memória (Titterness et al., 2011). O aumento nos níveis da concentração de glutamato na fenda sináptica é um dos mecanismos celulares e moleculares propostos para explicar os processos de memória (LTP) (Bliss and Collingridge, 1993).

O glutamato é liberado nos terminais sinápticos, principalmente, a partir dos estoques vesiculares num mecanismo dependente de cálcio, que envolve canais para cálcio dependentes de voltagem. Entretanto, o glutamato pode ser liberado também por um mecanismo não-vesicular e independente de cálcio (Nicholls et al., 1987a). Essa liberação se deve, provavelmente, à reversão dos transportadores de glutamato presentes na membrana plasmática (Sanchez-Prieto et al., 1996).

Neste protocolo, investigaremos se o aumento da eficiência na liberação de glutamato poderia justificar o aumento da memória dos animais EXE, observada no protocolo anterior. Pretendemos ainda diferenciar a liberação dependente e independente de cálcio entre os dois grupos (SED e EXE).

Hipótese: O exercício físico aumenta a liberação de glutamato nos terminais pré-sinápticos de neurônios hipocampais.

Metodologia: Para investigarmos este fenômeno, a quantidade de glutamato liberada pelo terminal pré-sináptico foi determinada realizando experimentos de liberação contínua de glutamato em sinaptossomas hipocampais utilizando-se dois estímulos: KCl (liberação dependente de cálcio) (Nicholls et al., 1987a) e veratridina (liberação independente de cálcio) (Cousin et al., 1993; Nicholls, 1993).

•Preparação dos sinaptossomas

Quando o glutamato é liberado pelos sinaptossomas, sofre oxidação pela enzima glutamato desidrogenase (GDH), onde o NADP^+ adicionado ao meio de reação é convertido a NADPH. Ao ser excitado por luz, em comprimento de onda de 360 nm, o NADPH emite luz no comprimento de onda de 450 nm, que é detectada no espectrofluorímetro (Nicholls et al., 1987; Romano-Silva et al., 1993).

Para a preparação dos sinaptossomas, os animais foram sacrificados por decapitação, seguindo-se a imediata remoção do cérebro e transferência para solução gradiente (0,32 M sacarose, 1 mM EDTA e 0,25 mM ditioneitol (DTT), pH 7,4 com NaOH 1 M), mantido em banho de gelo. Os dois hemisférios cerebrais foram separados, o hipocampo dissecado sobre uma placa de Petri imersa em gelo e contendo papel de filtro umedecido com o meio de incubação.

Os hipocampus foram transferidos para um tubo (Potter-Elvehjem) contendo 1,5 mL de solução gradiente pH 7,4 mantido no gelo e

homogeneizados 10 vezes com movimentos “up and down”. O homogenato foi transferido para um tubo apropriado e centrifugado a 1.000 g por 10 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada (HITACHI, Japão). Após a centrifugação, o sobrenadante (aproximadamente 1ml) foi coletado com auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferido para um tubo tipo eppendorf. O conteúdo do tubo eppendorf foi transferido com o auxílio de uma bomba peristáltica a um tubo de centrífuga contendo o gradiente de percoll, montado com 2 mL das soluções de 3, 10, 15 e 23% V/V de percoll em solução gradiente pH 7,4 (adaptado de: (Dunkley et al., 1988).

Os tubos foram centrifugados a 36.000 g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação foram recolhidas as frações 3 e 4 que foram transferidas para tubo de centrífuga, onde o volume foi completado para 50 mL com meio de KRH sem cálcio (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 10 mM glicose, 25 mM HEPES, pH 7,4 com NaOH 5 M). Novamente, o tubo foi centrifugado a 36.000 g por 20 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” transferido para tubo eppendorf (2ml), completado com KRH sem cálcio e centrifugado a 15.000 g por 15 segundos à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi desprezado e os sinaptossomas ressuspendidos em 0,45 mL de meio KRH sem cálcio. Uma alíquota da suspensão sinaptossomal (15µl) foi congelada a -20°C para posterior dosagem de proteínas (Bradford, 1976a; Bradford, 1976b). O tubo com sinaptossomas foi mantido no gelo até o momento da incubação para o estímulo com KCL ou até a leitura para o estímulo com veratridina.

• Liberação contínua de glutamato

Quando o glutamato é liberado pelos sinaptossomas, sofre oxidação pela enzima glutamato desidrogenase (GDH), onde o NADP⁺ adicionado ao meio de reação é convertido a NADPH. Ao ser excitado por luz, em comprimento de onda de 360 nm, o NADPH emite luz no comprimento de onda de 450 nm, que é

detectada no espectrofluorímetro (Nicholls et al., 1987b; Romano-Silva et al., 1993).

Para a liberação de glutamato desencadeada por estímulo com KCL, tubos contendo suspensão de sinaptossomas foram incubados a 35°C por 30 minutos e, em seguida, diluídos com KRH sem cálcio e incubados por mais 30 minutos a 35°C. Depois dessa última incubação, os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 15 segundos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em KRH sem cálcio. A suspensão resultante foi transferida para leitura da fluorescência em espectrofluorímetro de placa (Synergy 2, BioTek, USA), com excitação 360/40 e emissão 460/40, e mantida a 37°C por um tempo de leitura de 900 segundos.

Para favorecermos a liberação de glutamato independente de cálcio, utilizamos a veratridina como estímulo (Bicalho et al., 2002; Cousin et al., 1993) e a suspensão sinaptossomal não foi incubada (Nicholls et al., 1987b), a preparação permaneceu no gelo até o momento da leitura.

Antes do início da leitura foram adicionados aos poços da placa:

- KRH com Ca^{+2} (1mM): quantidade para completar 300µl de volume final;
- Sinaptossomas (30µl)

Para leitura da fluorescência, foram adicionadas à placa, as seguintes substâncias, nos seguintes intervalos de tempo:

NADP ⁺	1 mM	90 segundos
GDH	5µL (1U/µL)	150 segundos
Estímulo: KCL Veratridina	33mM 10µM	300 segundos
Término do registro		900 segundos

Para quantificar o glutamato liberado, foi feita uma curva padrão de glutamato, na faixa de 0,5 a 10 nmoles. As leituras foram feitas em triplicatas e a concentração final de glutamato (nmol) foi normalizada pela concentração de

proteínas da respectiva amostra. O resultado foi expresso como média \pm EPM de nmols de glutamato liberados por miligramas de proteína.

Resultados:

Os dois estímulos aplicados (KCL e veratridina) foram capazes de induzir a liberação de glutamato nos sinaptossomas hipocampais dos dois grupos (figura 5). A cinética de liberação de glutamato evocada por KCL está representada na figura 5A. Observa-se uma fase inicial rápida de liberação, seguida por uma fase tardia de liberação lenta. A magnitude da resposta, entre os dois grupos, apresenta-se diferenciada já na fase inicial, obtendo-se maior valor para os animais EXE. A análise da cinética para o estímulo com veratridina foi prejudicada, pois, o primeiro ponto de leitura foi registrado aproximadamente 1 minuto após o estímulo (figura 5B).

Como mostra a figura 5C, a quantidade de glutamato liberado por sinaptossomas hipocampais de ratos EXE ($24,4 \pm 2,4$ nM/mg proteína; n=8) foi aproximadamente 53% superior à liberada por animais SED ($15,9 \pm 2,7$ nM/mg proteína; n=8), quando foram estimulados com KCL (teste *t* de Student, $p < 0,05$). Porém, quando a liberação de glutamato foi estimulada com veratridina (figura 5D), não foi observada diferença entre o grupo SED ($12,7 \pm 4$ nM/mg proteína; n=6) e o EXE ($14,2 \pm 4,2$ nM/mg proteína; n=6) (teste *t* de Student, $p > 0,05$).

Além disso, a comparação intra grupo mostrou capacidade similar entre KCL e veratridina na liberação de glutamato para o grupo sedentário (KCL = $15,9 \pm 2,7$ nM/mg proteína; n=8 e VER = $12,7 \pm 4$ nM/mg proteína; n=6; teste *t* de student $p > 0,05$). Entretanto, os sinaptossomas de animais EXE liberaram maior quantidade de glutamato quando estimulados com KCL (KCL = $24,4 \pm 2,4$ nM/mg proteína; n=8 e VER = $14,2 \pm 4,2$ nM/mg proteína; n=6; teste *t* de Student, $p < 0,05$).

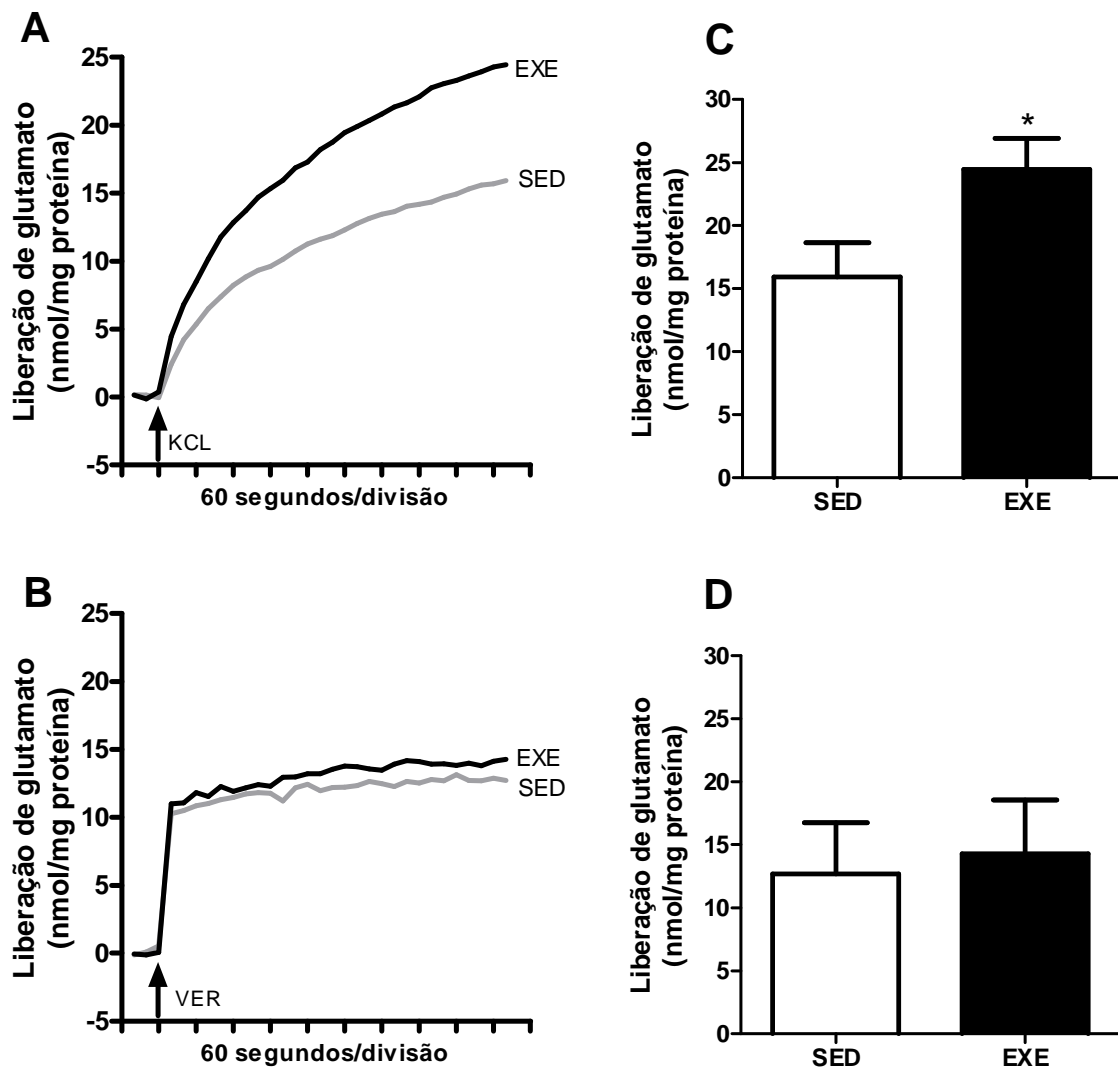


Figura 5. Liberação contínua de glutamato em sinaptossomas hipocâmpais. (A,B) Curva representativa (média de $n=8$) da liberação de glutamato, em função do tempo, para KCL e veratridina (VER), respectivamente. **(C,D)** Liberação de glutamato em nmol glutamato/mg proteína, para KCL e veratridina respectivamente, após 900s do estímulo. SED: sedentários e EXE: exercício. Os dados estão representados como média \pm EPM. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Para o estímulo com KCL os valores são: SED ($n=8$): $15,91 \pm 2,7$. EXE ($n=8$): $24,44 \pm 2,4$. Para o estímulo com veratridina os valores são: SED ($n=6$): $12,7 \pm 4$. EXE ($n=6$): $14,2 \pm 4,2$. * $p < 0,05$ em teste t de Student.

Discussão parcial: O papel dominante do glutamato na transferência rápida das informações no SNC, bem como o seu envolvimento nos modelos de memória e aprendizado (Collingridge and Singer, 1990; Dolphin et al., 1982); o tornaram um potencial candidato para elucidar os efeitos cognitivos benéficos mediados pelo exercício físico.

Para investigar a função glutamatérgica nos animais submetidos ao exercício físico, foram utilizados sinaptossomas (terminal pré-sináptico isolado). Os sinaptossomas são amplamente utilizados desde a década de 60, como modelo para estudo dos mecanismos pré-sinápticos envolvidos no processo de liberação de neurotransmissores (Gray and Whittaker, 1962). A liberação do neurotransmissor glutamato de sinaptossomas hipocampais foi avaliada utilizando-se como estímulo o KCL e a veratridina, nos permitindo desta forma, avaliar os componentes de liberação de glutamato cálcio-dependente e cálcio-independente, respectivamente.

O KCL despolariza a membrana sinaptossomal e deflagra a liberação do glutamato contido nas vesículas sinápticas, este é um mecanismo primordialmente dependente de cálcio (Nicholls et al., 1987a). A veratridina é uma toxina que se liga aos canais para sódio retardando sua inativação. O contínuo influxo de sódio colapsa o gradiente eletroquímico para o sódio e resulta em reversão do co-transportador Na^+ /Glutamato e posterior liberação do glutamato contido no citosol. Este é um mecanismo, em grande parte, independente de cálcio (Cousin et al., 1993; Nicholls, 1993).

Os nossos resultados indicam que tanto o KCL quanto a VER foram capazes de induzir a liberação de glutamato em sinaptossomas hipocampais, nos dois grupos avaliados (SED e EXE), o que comprova a viabilidade da preparação.

A quantidade de glutamato liberado pelos sinaptossomas hipocampais de animais EXE foi significativamente maior do que a dos animais SED, quando estimuladas com KCL, o qual despolariza a membrana e ativa CCDV desencadeando a excitose (Nachshen, 1985). Além disso, a observação da cinética da curva de liberação (figura 5A) sugere que existem diferenças tanto na

fase rápida inicial, quanto na fase tardia lenta, mostrando aumento na liberação de glutamato nestes dois momentos. A fase rápida é decorrente da exocitose das vesículas já ancoradas na membrana (McMahon and Nicholls, 1991; McMahon et al., 1992). O aumento da liberação na segunda fase pode estar relacionado com a maior eficiência na mobilização das vesículas reservas no citosol. As duas fases são dependentes do cálcio externo e de ATP (McMahon and Nicholls, 1991).

De maneira diferenciada do efeito do exercício sobre a liberação de glutamato cálcio-dependente mediada pelo KCL, quando utilizamos a VER, não observamos qualquer efeito do exercício sobre a liberação de glutamato. Para a discussão deste resultado devemos considerar que neste protocolo os sinaptossomas não foram incubados. Segundo Nicholls e cols. (1987), o período de incubação é importante para que ocorra a recaptação do glutamato contido no meio externo e a reposição do glutamato para o interior das vesículas. Dito isso, podemos considerar duas hipóteses: a reversão do co-transportador Na^+ /Glutamato é igualmente eficiente para os dois grupos ou o exercício físico altera a eficiência do co-transportador, mas devido à não recuperação dos estoques internos, esta diferença não foi evidenciada.

3.3. Efeito do exercício físico sobre o cálcio intrasinaptossomal de neurônios hipocampais

A propagação do potencial de ação em células nervosas leva à abertura de canais para cálcio dependentes de voltagem (CCDV), com consequente aumento na concentração intracelular de cálcio no terminal nervoso. Um grande número de evidências demonstra que o influxo de íons Ca^{2+} através dos CCDV no terminal nervoso pré-sináptico é necessário para a liberação de neurotransmissores (Reuter, 1996; Zucker, 1993). Adicionalmente, a regulação destes canais pré-sinápticos influencia intensamente a força sináptica, contribuindo para os mecanismos de plasticidade pré-sináptica (Catterall and Few, 2008). Devido à estreita relação entre os processos plásticos relacionados

à memória, a liberação de neurotransmissores e a concentração de Ca^{2+} ; e considerando a análise dos dados obtidos nos protocolos prévios que indicam modulação na liberação cálcio-dependente de glutamato nos sinaptossomas hipocampais de animais exercício, neste protocolo vamos investigar se o exercício físico altera a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ em sinaptossomas, justificando o efeito modulatório na liberação de glutamato.

Hipótese: O exercício físico aumenta a entrada de cálcio no terminal pré-sináptico hipocampal, o que pode favorecer a liberação de neurotransmissores.

Metodologia: A entrada de cálcio no terminal pré-sináptico foi determinada utilizando-se a preparação de sinaptossomas e a marcação com a sonda fluorescente Fura-2 AM.

• **Determinação do cálcio intra-sinaptossomal livre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)**

Para determinação do $[\text{Ca}^{2+}]_i$, os sinaptossomas foram preparados conforme a metodologia descrita anteriormente (Nicholls et al., 1987b; Romano-Silva et al., 1993).

O ensaio utilizado foi o método fluorimétrico, empregando-se a sonda FURA-2-AM (Sigma Aldrich, USA). Ao cruzar a membrana citoplasmática, ela é clivada por esterases inespecíficas presentes no citoplasma e se transforma em FURA-2, que é hidrofílico suficiente para não escapar do interior dos sinaptossomas. O processo de determinação do $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se baseia no fato de que o FURA-2 tem sua fluorescência aumentada quando se liga aos íons cálcio. Para isso os sinaptossomas foram pré-incubados com FURA-2 AM, na ausência de cálcio externo. Em 0,1 mL da suspensão sinaptossomal foi adicionado 0,5 μL (5 μM) de FURA-2 AM (solução estoque de 1 mM em dimetil sulfóxido- DMSO) e a mistura foi incubada por 30 minutos a 35°C. Sinaptossomas controles foram incubados somente com o veículo (DMSO) para determinarmos a autofluorescência. Após este período, foram adicionados 0,35 mL de KRH sem cálcio e a mistura foi mantida no banho por mais 30 minutos. Ao término da marcação, os sinaptossomas foram centrifugados a 15.000 g por 15 segundos à

temperatura ambiente em microcentrífuga e ressuspendidos em 0,3 mL de KRH com cálcio. A leitura foi realizada em espectrofluorímetro de placa (Synergy 2, BioTek, USA), e a temperatura foi mantida a 37°C.

O FURA-2 livre apresenta excitação máxima no comprimento de 380nm e quando ligado ao cálcio de 340nm. Portanto, os sinaptosomas foram iluminados alternadamente com luz nos comprimentos de 340 e 380nm, e a luz emitida, no comprimento de 505nm. Para calibração, utilizou-se o EGTA (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) para calcular a fluorescência mínima e o SDS 10% para obtenção da fluorescência máxima. Os pontos foram registrados em intervalos de 74ms.

Para leitura da fluorescência, foram adicionadas à placa, as seguintes substâncias, nos seguintes intervalos de tempo:

Estímulo:		
KCL	33mM	120 segundos
SDS	10 %	510 segundos
EGTA	10mM	570 segundos
Término do registro		630 segundos

O cálculo da variação do $[Ca^{2+}]_i$ foi realizado seguindo a fórmula descrita por Grynkiewicz (1985) :

$$[Ca^{2+}]_i = K_D \cdot \beta \cdot (R - R_{min} / R_{max} - R)$$

Onde:

K_D = constante para Fura2 = 225nM;

R = razão entre fluorescência 340/380;

R_{max} = fluorescência com SDS;

R_{min} = fluorescência com EGTA;

β = S_{livre}/S_{ligado} = fluorescência 380 com EGTA/ fluorescência 380 com SDS;

O resultado foi expresso como média \pm EP nM de cálcio. Foram quantificadas as concentrações basais e as fases inicial e a final da entrada de cálcio. A fase inicial consiste na quantidade de cálcio que entra no sinaptossoma imediatamente após o estímulo e a fase final na quantidade de cálcio que entra no sinaptossoma no intervalo de tempo total do registro, considerando para o cálculo os 10 últimos pontos registrados.

Resultados: Os resultados apresentados na figura 6 mostram que a concentração de cálcio basal, em sinaptossomas hipocâmpais de animais EXE ($136,2 \pm 31,4$ nM Ca^{2+} ; $n=4$), é maior quando comparada com a dos animais SED ($47,1 \pm 5$ nM Ca^{2+} ; $n=4$, teste t de Student $p<0,05$).

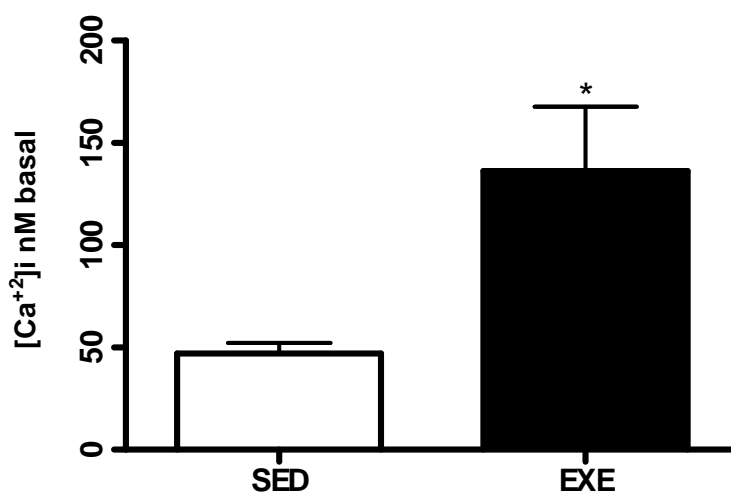


Figura 6. Cálcio intrasinaptossomal livre (basal) no hipocampo. Os sinaptossomas foram marcados com FURA 2-AM, e a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal (anterior ao estímulo) foi determinado por fluorimetria. Os dados estão representados como média \pm EP. SED = $47,1 \pm 5$ nM; $n=4$ e EXE = $136,2 \pm 31,4$ nM; $n=4$. Teste t de Student $*p<0,05$.

Uma vez que as concentrações de cálcio basais são diferentes, para ilustrarmos a cinética do registro, os dados foram normalizados (figura 7A). A quantidade de cálcio que entra nos sinaptossomas hipocâmpais (figura 7B) em resposta imediata à despolarização com KCL (fase inicial), foi maior para

animais EXE ($79,2 \pm 5,6$ nM Ca^{2+} ; $n=4$) que para os animais SED ($49,6 \pm 9,7$ nM Ca^{2+} ; $n=4$, teste t de Student $p<0,05$). Entretanto, não foi observada diferença quando comparada a quantidade total que entrou nos sinaptossomas hipocampais do SED ($135,4 \pm 26,7$ nM Ca^{2+} ; $n=4$) e do EXE ($173,9 \pm 19,4$ nM Ca^{2+} ; $n=4$, teste t de Student $p>0,05$), no decorrer dos 7min de registro, o que denominamos de fase final (figura 7C, média dos últimos 10 pontos registrados).

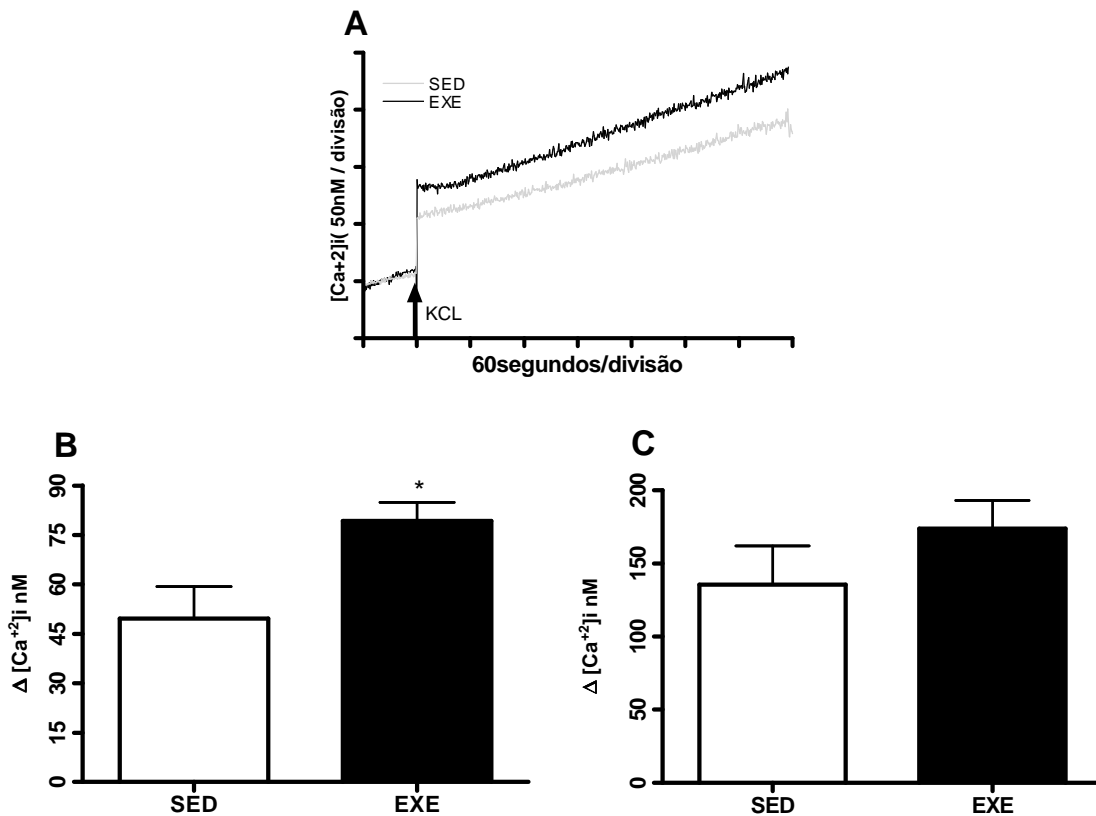


Figura 7. Entrada de cálcio intrasinaptossomal decorrente da despolarização com KCL. Os sinaptossomas foram marcados com FURA 2-AM, KCL (33mM) foi adicionado e o aumento no $[\text{Ca}^{2+}]_i$ determinado por fluorimetria. **(A)** As Curvas temporais dos registros do cálcio intrasinaptossomal representam as médias dos valores dos animais dos SED ($n=4$) e EXE ($n=4$). **(B)** Os valores do aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na fase inicial são: SED = $49,6 \pm 9,7$ nM e EXE $79,2 \pm 5,6$ nM. **(C)** Fase final: SED = $135,4 \pm 26,7$ nM; $n=4$ e EXE = $173,9 \pm 19,4$ nM; $n=4$. Os dados estão representados como média \pm EP. Teste t de Student * $p<0,05$.

Discussão parcial: Correlações positivas entre aumento da concentração de cálcio basal e os processos de memória foram feitas por Satoh e Shimeki (2010). Utilizando-se sinaptossomas cérebro-corticais de animais submetidos ao modelo de estresse agudo de contenção, conhecido por potencializar eventos de memória, relataram aumento da concentração basal de cálcio, além do incremento na habilidade destes sinaptossomas aumentarem o influxo de cálcio e a liberação de glutamato quando estimulados com KCL (Satoh and Shimeki, 2010). Em outro estudo, observou-se aumento do cálcio intrasinaptossomal livre, utilizando-se preparação de sinaptossomas hipocampais após a indução de LTP em giro denteado (Lynch and Voss, 1991). Entretanto, encontramos também dados que relatam consequências negativas deste aumento. Satrústegui e cols. (1996) observaram aumento da $[Ca^{2+}]_i$ em sinaptossomas hipocampais de ratos idosos e justificaram esta alteração pela diminuição dos mecanismos homeostáticos destes animais (Satrustegui et al., 1996).

Até o momento, não existem na literatura relatos sobre o efeito do exercício físico sobre a $[Ca^{2+}]_i$, mas de maneira interessante, o exercício físico aumenta a concentração de cálcio plasmático e, conseqüentemente, a concentração de cálcio no cérebro (Sutoo and Akiyama, 2003). Podemos especular que o aumento observado na concentração basal de cálcio intrasinaptossomal é decorrente do aumento da disponibilidade do cálcio extracelular, que provavelmente gera adaptações positivas nas vias de sinalização do cálcio neuronal, acarretando efeitos benéficos do exercício sobre o SNC.

Adicionalmente ao aumento na $[Ca^{2+}]_i$ basal, observamos o aumento na entrada de cálcio nos sinaptossomas dos animais treinados, quando despolarizados com KCL. Considerando a grande importância do transiente de cálcio no terminal pré-sináptico, para que ocorra a neurotransmissão (Katz, 1969), este dado pode explicar o aumento na habilidade dos sinaptossomas hipocampais dos animais treinados em liberar glutamato e, conseqüentemente, modular os processos de memória.

3.4. Efeito do exercício físico sobre a liberação de glutamato hipocampal modulada pelo cálcio intra-sinaptossomal

A relação entre o aumento no cálcio intra-sinaptossomal livre e a liberação de neurotransmissores tem sido mostrado há muitos anos (Katz, 1969). Existem duas fontes principais que disponibilizam cálcio para o citosol. A primeira é pelo influxo do cálcio extracelular através dos CCDV presentes na membrana celular e a segunda é pela liberação do cálcio contido nos estoques internos (Ghosh and Greenberg, 1995).

Os resultados obtidos nos protocolos anteriores indicaram que o exercício físico foi capaz de modular a entrada de cálcio no terminal pré-sináptico e adicionalmente modular a liberação do glutamato contido nas vesículas, através de um processo dependente de cálcio. A fim de verificar a relação entre a $[Ca^{2+}]_i$ e a modulação na liberação de glutamato nos animais treinados e identificar alvos desta modulação, vamos investigar a influência dos canais para cálcio dependentes de voltagem, dos estoques de cálcio intracelulares e do cálcio externo, no aumento da liberação de glutamato observada.

Hipótese: o exercício físico potencializa a liberação de glutamato, nos sinaptossomas hipocampais, por modular a $[Ca^{2+}]_i$.

Metodologia: A liberação de glutamato foi determinada como descrito em protocolo anterior. Realizamos o ensaio experimental utilizando como estímulo o KCl e adicionamos à preparação quelantes de cálcio e bloqueadores de canais para cálcio.

Os sinaptossomas foram transferidos para leitura da fluorescência no espectrofluorímetro (excitação 360/40; emissão 460/40) e mantidos a 37°C por um tempo de leitura de 900 segundos. Seis pontos foram registrados:

Ponto 1 (controle) – Glutamato liberado sem estímulo;

Ponto 2 (liberação total) – Glutamato liberado com KCL 33mM;

Ponto 3 (liberação independente de Ca^{+2} externo) – Neste ponto não foi adicionado cálcio ao meio de incubação, em seu lugar foi adicionado EGTA (2mM).

Ponto 4 (liberação independente de Ca^{+2} interno) - No primeiro momento da incubação (35°C por 30 min) foi adicionado ao meio EGTA-AM (50µM).

Ponto 5 (liberação independente de CCDV tipo N-P/Q) – Um minuto antes do estímulo com KCl foi adicionado à preparação o bloqueador de CCDV ω -conotoxin MVIIC 1µM (Randall and Tsien, 1995);

Ponto 6 (liberação independente de CCDV tipo P) (Randall and Tsien, 1995). Um minuto antes do estímulo com KCl foi adicionado à preparação o bloqueador de CCDV ω -Agatoxin IVA (30nM);

No momento da leitura foram adicionadas as seguintes substâncias, nos seguintes intervalos de tempo:

NAD	1mM	90s
GDH	5U	150s
KCL	33mM	300s

Para quantificar o glutamato liberado, foi feita uma curva padrão de glutamato, na faixa de 0,5 a 10 nmoles. As leituras foram feitas em triplicatas e a concentração final de glutamato (nmol) foi normalizada pela concentração de proteínas da respectiva amostra. O resultado foi expresso como média \pm EPM de nmols de glutamato liberados por miligramas de proteína.

Resultados: Os dados apresentados na figura 8 indicam que a despolarização dos sinaptossomas hipocâmpais com 33mM de KCL foi eficiente em evocar a liberação de glutamato, nos dois grupos, mesmo na presença dos bloqueadores dos CCDV e dos quelantes de cálcio utilizados.

Para efeito didático de comparação, os dados de liberação total induzida por KCL do protocolo 3.2 foram repetidos aqui. O teste ANOVA de medidas repetidas, seguido do pós teste de Newman-Keuls confirma a importância do

transiente de cálcio para a liberação do glutamato, mostrando que os quelantes e bloqueadores dos CCDV foram capazes de inibir significativamente a liberação de glutamato quando comparamos a liberação total com a liberação na presença das drogas (figura 8).

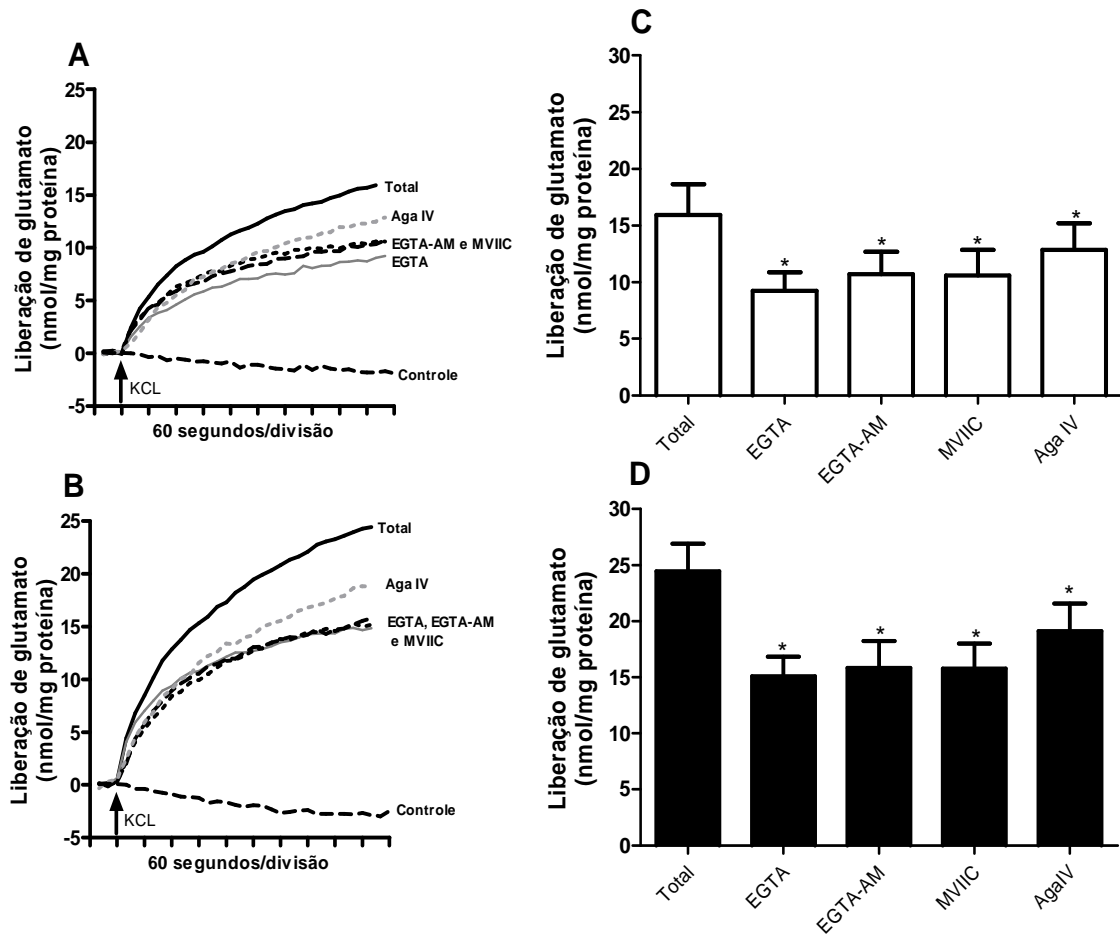


Figura 8. Liberação de glutamato hipocampal modulada pelo cálcio intra-sinaptossomal. (A,B) Curva dos valores médios da liberação de glutamato sinaptossomal em função do tempo para SED e EXE respectivamente (n=8). **(C,D)** Os resultados das condições controle, liberação total, EGTA, EGTA-AM, MVIIC e AgaIV estão representados como média \pm EPM nmol glutamato/mg para SED (total = $15,9 \pm 2,7$; EGTA = $9,2 \pm 1,6$; EGTA-AM = $10,6 \pm 2$; MVIIC = $10,6 \pm 2,2$ e AgaIV = $12,8 \pm 2,3$) e EXE (total = $24,4 \pm 2,4$; EGTA= $15,1 \pm 1,7$; EGTA-AM = $15,8 \pm 2,4$; MVIIC = $15,7 \pm 2,2$ e AgaIV= $19,1 \pm 2,4$), respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicatas. ANOVA de medidas repetidas seguida de pós-teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ em relação à liberação total do respectivo grupo.

A comparação dos valores entre os grupos indicou aumento da liberação de glutamato no grupo EXE, apenas para a liberação total (como demonstrado no protocolo 3.2) e para a liberação na presença de EGTA. (tabela 1).

Tabela 1: Liberação de glutamato hipocampal modulada pelo cálcio intrasinaptossomal (comparação entre os grupos)

	TOTAL	EGTA	EGTA-AM	MVIIC	AgalV
SED	15,9 ± 2,7 ^a	9,2 ± 1,6 ^a	10,6 ± 2,0 ^a	10,6 ± 2,2 ^a	12,8 ± 2,3 ^a
EXE	24,4 ± 2,4 ^b	15,1 ± 1,7 ^b	15,8 ± 2,4 ^a	15,7 ± 2,2 ^a	19,1 ± 2,4 ^a

Letras minúsculas referem-se à comparação entre linhas. Número de animais por grupo = 8. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os valores encontrados. $p < 0,05$ pelo teste *t* não-pareado.

Discussão parcial:

Em terminais nervosos, coexistem múltiplos tipos de canais para cálcio, os quais regulam não só a entrada de cálcio no terminal, mas também a neurotransmissão. Com o intuito de investigar os tipos de canais para cálcio modulados pelo exercício nos terminais nervosos e a influencia destes na liberação de glutamato, testamos a ação de toxinas que interferem com o aumento intracelular dos níveis de cálcio, induzidos por despolarização com KCl.

Os canais tipo N e P/Q além de participarem da transmissão sináptica, estão altamente concentrados nos terminais nervosos. Os canais Tipo-P/Q são os de maior importância para a liberação de neurotransmissores nos terminais centrais (Guatimosim et al., 1997; Takahashi and Momiyama, 1993). A escolha das toxinas foi orientada pela afirmação anterior.

A toxina ω -AgalVA (30 nM) afeta, predominantemente, canais para cálcio Tipo-P (Mintz et al., 1992) e inibe em 24% o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ induzido por KCl em sinaptossomas cérebro-corticais (Meder et al., 1997). A corrente de cálcio Tipo-Q é a segunda principal corrente e, em conjunto com a do Tipo-P, representa quase metade do total das correntes de cálcio no sistema nervoso central (Randall and Tsien, 1995). As correntes de cálcio Tipo-P (Mintz et al.,

1992) e Tipo-Q são muito similares, e ambas, juntamente com a corrente do Tipo-N, são bloqueadas por concentrações saturantes (1 μ m) da ω -conotoxina MVIIC (Randall and Tsien, 1995).

Nossos dados mostram que o bloqueio das correntes de cálcio tipo N-P/Q, pelas toxinas ω -AgaIVA e MVIIC, igualou a liberação de glutamato nos terminais nervosos dos animais EXE, quando comparados aos SED; sugerindo haver influência do exercício físico sobre a liberação de glutamato que ocorre pela ação dos CCDV Tipo N-P/Q.

Outro ponto importante a ser considerado é o fato de que, além da reconhecida importância do influxo de cálcio no terminal pré-sináptico através dos CCDV, para que ocorra a neurotransmissão, estoques intracelulares regulam a concentração de cálcio interno influenciando a liberação de neurotransmissores e a transmissão sináptica (Sandoval, 1980).

Nossos dados mostram que houve aumento da liberação de glutamato, na presença de EGTA. Uma vez excluída a participação do Ca^{2+} externo, devido à presença de EGTA, e a indicação de que a função do co-transportador não está alterada (protocolo 3.2), uma possibilidade seria a potenciação na participação dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , na liberação do glutamato nos animais EXE. De fato, quando utilizamos o EGTA-AM para quelar o Ca^{2+} interno os valores de glutamato liberado foram equivalentes, corroborando esta hipótese.

Além disso, o aumento na liberação de glutamato na presença de EGTA, bem como o aumento da liberação total de glutamato pelos sinaptossomas hipocámpais dos animais EXE, pode indicar, também alteração no conteúdo intrasinaptossomal de glutamato (Nicholls et al., 1987b).

CAPÍTULO II

EXERCÍCIO FÍSICO MODULANDO

HOMEOSTASE DO Ca^{2+} E

NEUROPROTEÇÃO

1. Considerações iniciais

O íon cálcio é um mediador chave no dano celular em vários processos degenerativos neuronais, incluindo a isquemia (Arundine and Tymianski, 2003), que é caracterizada por interrupção do fluxo sanguíneo para o encéfalo, o que pode ser consequência de um bloqueio nas artérias que irrigam determinada área (Brown, 2002; Wise et al., 2005).

O tecido cerebral tem um alto consumo de oxigênio e glicose, e depende quase exclusivamente da fosforilação oxidativa para a produção energética. Assim, restrições no fluxo sanguíneo limitam a oferta de substratos, particularmente oxigênio e glicose, o que prejudica a manutenção adequada dos gradientes iônicos (Martin et al., 1994). Com a depleção energética, o potencial de membrana é perdido, possibilitando que os neurônios e células gliais despolarizem-se (Katsura et al., 1993). Consequentemente, os somatodendritos, bem como os canais para Ca^{+2} dependentes de voltagem pré-sinápticos tornam-se ativados e neurotransmissores excitatórios são liberados no espaço extracelular. Ao mesmo tempo, os processos dependentes de energia, tais como recaptção dos neurotransmissores são impedidos, o que aumenta o acúmulo de glutamato no espaço extracelular (Dirnagl et al., 1999).

Os efeitos pós-sinápticos do glutamato são mediados por receptores de membrana funcionalmente e farmacologicamente distintos, tais como os receptores ionotrópicos tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), Cainato (KA), e 2-amino-3 (3-hidróxi-5-metilisoxazol-4-il) propionato (AMPA), bem como os receptores metabotrópicos (Hollmann and Heinemann, 1994). A abertura de receptores ionotrópicos leva à passagem de íons Na^+ , K^+ , e Ca^{+2} , dependendo do tipo de receptor. Os receptores metabotrópicos não estão necessariamente associados com o poro do canal iônico, mas suas ações dependem de proteínas de ligação dependente de GTP, levando à mobilização de Ca^{+2} por meio da mobilização de estoques internos, tais como retículo endoplasmático (Sattler and Tymianski, 2000).

O aumento intracelular excessivo de Ca^{2+} , mediado pelo glutamato, prejudica a homeostase deste íon, ativando enzimas proteolíticas, estresse oxidativo,

peroxidação lipídica, atividade de endonucleases, entre outros que contribuem para o processo de morte neuronal (Dafre et al., 2003; Johansson and Belichenko, 2002).

Desta forma, a manutenção da homeostase de Ca^{+2} é crucial para a sobrevivência dos neurônios, e a mitocôndria é a principal organela responsável por sequestrar cálcio quando este íon se acumula no citosol (Nicholls and Budd, 2000). Entretanto, este não é um processo isento de problemas, a captação excessiva de cálcio para o interior da mitocôndria resulta na formação de espécies oxidativas e abertura do poro de transição mitocondrial (PTM). Este fenômeno é caracterizado por uma permeabilização da membrana mitocondrial interna para íons e pequenas proteínas (<1500Da) (Gunter and Pfeiffer, 1990; Kowaltowski et al., 2001; Zoratti and Szabo, 1995).

Além de causar necrose, a PTM pode levar à apoptose, uma vez que a mitocôndria contém em seu interior proteínas como o citocromo c, fatores indutores de apoptose e pró-caspases (Liu et al., 1996; Susin et al., 1999; Zhivotovsky et al., 1999).

2. Objetivos específicos

- Avaliar efeito neuroprotetor do exercício físico em modelo de isquemia *in vitro*, analisando dano e viabilidade celular em hipocampo;
- Investigar o efeito do exercício físico sobre a excitotoxicidade, avaliando a quantidade de glutamato acumulado em perfusato de hipocampo, em resposta à isquemia *in vitro*;
- Avaliar a capacidade de retenção de cálcio das mitocôndrias hipocâmpais de animais treinados, bem como analisar seu limiar para abertura do PPT;
- Comparar, entre os animais treinados e sedentários, a expressão das proteínas que compõem o PPT; ciclofilina D e ANT.

3. Protocolos experimentais

3.1. Neuroproteção hipocampal mediada por exercício físico

Acidente vascular encefálico (AVE) é uma definição clínica usada para descrever sintomas de desordens neurológicas agudas, causadas por distúrbios do fluxo sanguíneo cerebral. Esta doença cerebrovascular tem sido classificada em duas grandes categorias, AVE isquêmico e hemorrágico. O AVE isquêmico é caracterizado por interrupção do fluxo sanguíneo para o encéfalo, o que pode ser consequência de um bloqueio nas artérias que irrigam determinada área. O AVE hemorrágico ocorre devido ao rompimento de uma artéria, causando extravasamento de sangue dentro ou ao redor do tecido encefálico (Brown, 2002; Wise et al., 2005).

O AVE é uma das doenças que mais mata no Brasil e no mundo. (White et al., 2000). O AVE isquêmico é quatro vezes mais comum que o hemorrágico (Winstein et al., 1999). É caracterizado pela privação de oxigênio e glicose para o tecido encefálico, consequente da interrupção completa ou parcial do fornecimento de sangue ao tecido (Lee et al., 2003). O cérebro é particularmente vulnerável ao dano isquêmico, devido à alta taxa metabólica e a uma restrita reserva energética (Meldrum, 1990).

Em modelos experimentais, a isquemia pode ser realizada *in vivo* e *in vitro*. No primeiro, a isquemia pode ser reproduzida experimentalmente pela oclusão temporária das artérias carótidas comuns (Smith et al., 1984), pela oclusão permanente das artérias vertebrais seguida da oclusão transitória das carótidas (Pulsinelli and Brierley, 1979). Contudo, o modelo de isquemia, *in vivo*, mais utilizado é o da oclusão irreversível ou transitória da artéria cerebral média (MCAO) (Smith et al., 1984).

As alterações metabólicas e iônicas na região do insulto não são homogêneas. No centro, onde o fluxo é 20% menor que o normal, as células sofrem uma despolarização logo após o início da isquemia e rapidamente morrem. Entre o centro e regiões não afetadas do cérebro, encontra-se a

penumbra, uma área com fluxo sanguíneo limitado, porém com parte da energia metabólica preservada (Dirnagl et al., 1999).

Na isquemia *in vitro*, uma alternativa é a utilização de cultivo de células ou de tecidos (Newell et al., 1993). Com o objetivo de mimetizar um evento isquêmico, tem-se utilizado a privação de oxigênio e glicose (POG) ao submeter fatias de tecidos em meio livre de glicose numa incubadora com atmosfera livre de oxigênio (Barth et al., 1996; Laake et al., 1999). O uso de fatias hipocâmpais é particularmente interessante, uma vez que boa parte da organização celular, células inflamatórias e conexões intercelulares estão preservadas (Cohen et al., 1984; Taylor et al., 1995). Adicionalmente, a POG é um método relativamente simples e reproduz aspectos importantes da isquemia *in vivo*, como a vulnerabilidade seletiva das células da região de CA1 (Tavares et al., 2001).

Hipóteses: O exercício físico possui atividade neuroprotetora em modelo de isquemia *in vitro*.

Metodologia:

- **Isquemia *in vitro***

Os animais foram sacrificados por decapitação. O cérebro, rapidamente e cuidadosamente removido, foi transferido para imersão em solução gelada (4°C) de aCSF (em mM: NaCl 125, KCl 2,5, MgCl₂ 3,0, CaCl₂ 0,1, glicose 25, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,25; pH 7,4) oxigenada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5 % CO₂). O cérebro foi seccionado em fatias transversais de 400µm em vibrátomo (Vibratome, Series 1000 – Technical Products International) e logo após, o hipocampo foi separado do restante do tecido.

As fatias isoladas do hipocampo de um mesmo animal foram aleatoriamente distribuídas em duas placas: (1) controle, não sujeita à privação oxigênio e glicose (NPOG) e (2) sujeita à privação oxigênio e glicose (POG).

As fatias permaneceram em banho-maria a 37 °C durante todo o protocolo de isquemia "*in vitro*" que consistiu em:

- uma hora para a recuperação do trauma mecânico (fatias incubadas com aCSF e carbogênio),
- uma hora de privação de oxigênio e glicose (somente no grupo POG o carbogênio foi substituído por nitrogênio e o aCSF não continha glicose)
- 4h de reperfusão, neste momento retornava-se o carbogênio e o aCSF com a glicose.

• **Avaliação do dano celular em fatias de hipocampo**

Para quantificação da morte celular utilizou-se o marcador etídio homodímero (EthD-1; *Molecular Probes Inc., USA*). Após o processo de isquemia com consequente perda da integridade e aumento da permeabilidade da membrana, ocorre uma diminuição e ou cessação da atividade esterásica, permitindo assim a entrada do marcador, que reage e eleva sua fluorescência em até 40 vezes à medida que se associa com ácidos nucleicos (Monette et al., 1998).

Ao final do período de reperfusão, as fatias de ambos os grupos foram submetidas, separadamente, aos seguintes procedimentos, todos realizados à temperatura ambiente e protegidos da luz:

- Marcação com EthD-1 (2mM), por 30 minutos, em presença de aCSF oxigenado e contendo glicose.
- Lavagem com aCSF oxigenado e contendo glicose por 15min;
- Fixação em paraformaldeído 4% por 15 minutos;
- Lavagem com tampão fosfato (PB) por 5 minutos;
- Lavagem rápida com aCSF, 2 vezes;
- Montagem em lâminas com hydromount (National Diagnostics, USA);
- Aquisição das imagens em microscópio de fluorescência (*Axio Imager.M2 - Zeiss*).

As imagens no microscópio de fluorescência foram adquiridas através do software *Carl Zeiss Axiovision 4.8*, com aumentos de 20x. A região CA1 foi selecionada e a captação da fluorescência resultante da marcação com EthD-1 foi realizada através de um filtro óptico correspondente a seu comprimento de

onda (excitação/emissão: 528/617nm). As imagens adquiridas foram salvas em alta resolução (1024x768) e gravadas em arquivos no formato *.tif para posterior quantificação.

A análise quantitativa das imagens foi realizada no software livre *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). As imagens foram inicialmente convertidas para 8-bits e processadas igualmente para diminuição do background. A porcentagem de células mortas marcadas foi quantificada, equivalente a intensidade dos pixels por região selecionada.

• **Avaliação da viabilidade celular em fatias de hipocampo**

A determinação da viabilidade celular das células do hipocampo foi avaliada utilizando-se o MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium), que é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em formazam púrpura após clivagem do anel de tetrazólio por desidrogenases mitocondriais, que estão presentes em células viáveis (Liu et al., 1997). O formazam é solubilizado com a adição de dimetil sulfóxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade óptica foi medida em espectrofotômetro (550 nm) (Mosmann, 1983).

Após o período de reperusão, as fatias de hipocampo foram incubadas por 45min a 37 °C na presença de MTT (0,45µg/ml, Sigma Chemicals). Após este período, o líquido de cor amarela foi descartado e as fatias hipocampais, que ficaram cor púrpura, foram incubadas por mais 30 minutos em DMSO. O DMSO que solubilizou o formazam e se tornou cor púrpura foi levado para a leitura no espectrofotômetro (550 nm). A viabilidade celular (atividade mitocondrial) é diretamente proporcional à capacidade redutora sobre o MTT e, portanto, produção de cromógeno (Cechetti et al., 2007).

Resultados: os dados da marcação de células mortas por EthD-1, obtidos por microscopia de fluorescência, estão representados na figura 9B. Um efeito significativo do protocolo de exercício físico foi observado sobre a porcentagem de morte celular nas fatias de hipocampo, na condição controle

(SED controle = $3 \pm 0,1\%$ e EXE controle = $2,1 \pm 0,2\%$, $p < 0,05$ teste t de Student). Além disso, o protocolo de isquemia *in vitro* foi capaz de causar dano celular em hipocampo de animais sedentários, apresentando maior marcação de células hipocâmpais após a isquemia (SED; controle = $3 \pm 0,1\%$ e isquemia = $4,3 \pm 0,5\%$, $p < 0,05$ teste t de Student). Porém o mesmo não ocorreu com os animais do grupo exercício, que apresentaram marcação equivalentes das células hipocâmpais, mesmo após a isquemia (EXE; controle = $2,1 \pm 0,2\%$ e isquemia = $2,7 \pm 0,3\%$, $p > 0,05$ teste t de Student). Adicionalmente, observa-se uma porcentagem aproximadamente 38% menor, de morte celular nas fatias de hipocampo dos animais do grupo exercício, submetidos à isquemia *in vitro* (SED isquemia = $4,3 \pm 0,5\%$ e EXE isquemia = $2,7 \pm 0,3$, $p < 0,05$ teste t de Student).

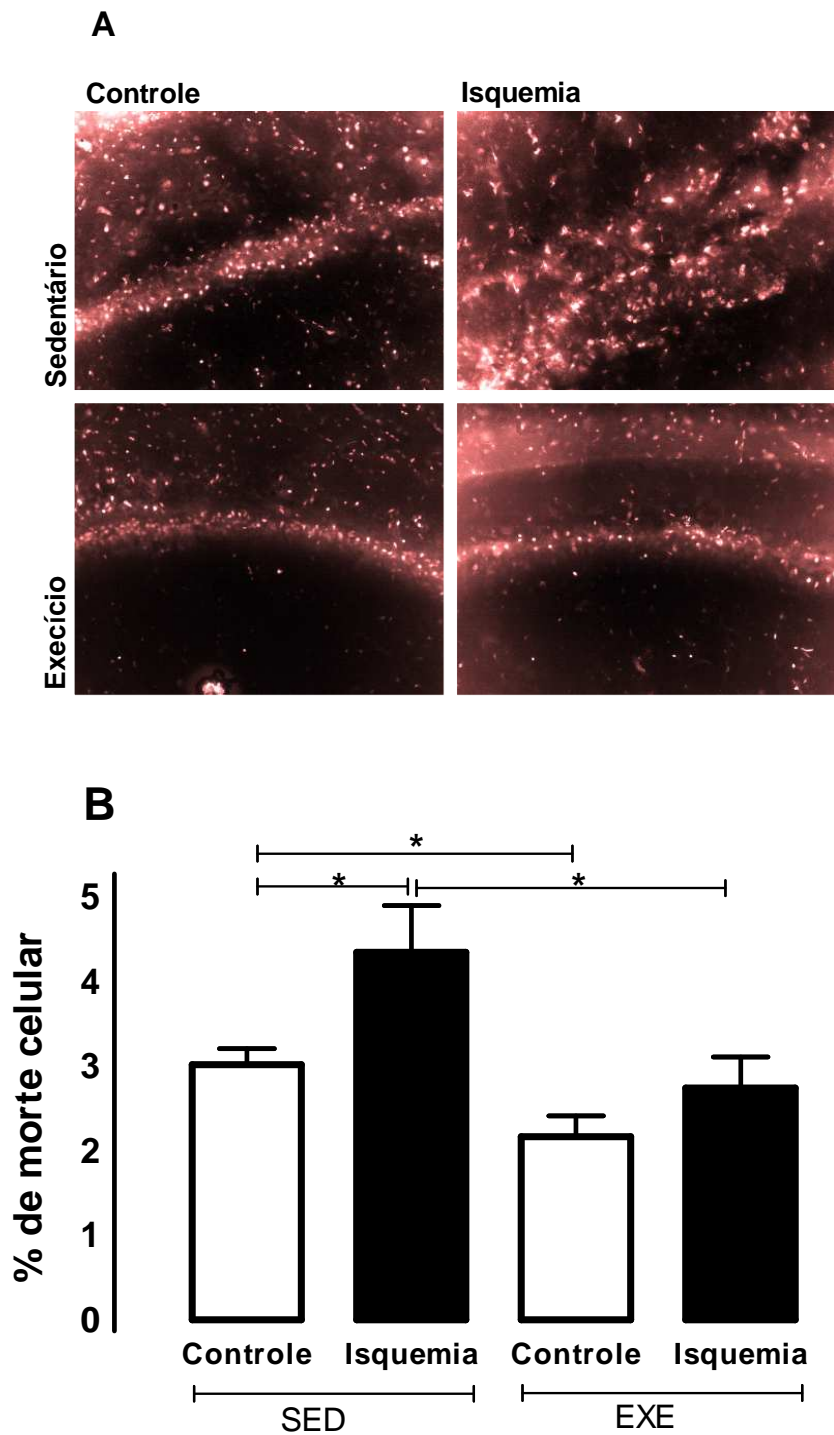


Figura 9. Efeito do exercício físico sobre o dano celular hipocampal após isquemia *in vitro*. (A) Imagens representativas das fatias de hipocampo no SED e EXE, nas condições controle e isquemia, marcadas com EthD-1 e avaliadas em microscópio de fluorescência. (B) Porcentagem de morte celular, na região CA1 de fatias de hipocampo, após isquemia *in vitro*. Número de animais por grupo = 5. * $p < 0,05$ em teste *t* de Student.

Os resultados obtidos na avaliação da viabilidade celular hipocampal através da análise da redução da atividade das desidrogenases mitocondriais (redução de MTT), corroboram os resultados anteriores sobre a avaliação do dano celular. Os dados apresentados na figura 10 foram normalizados pela média do respectivo controle. Como pode ser observado, o protocolo de isquemia *in vitro* foi capaz de diminuir a viabilidade celular em hipocampo de animais sedentários (SED; controle = $100 \pm 9\%$ e isquemia = $85 \pm 7\%$, $p < 0,05$ teste *t* de Student). Porém, o mesmo não ocorreu com os animais do grupo exercício, que apresentaram igualdade entre as condições controle e isquemia (EXE; controle = $100 \pm 7\%$ e isquemia = $100 \pm 7\%$, $p = 1$ teste *t* de Student).

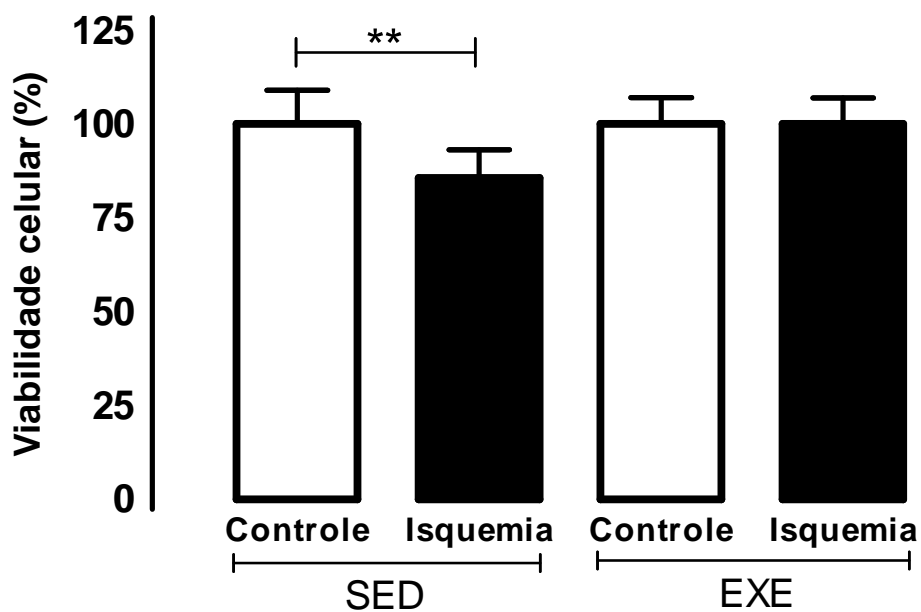


Figura 10. Efeito do exercício físico sobre a viabilidade celular hipocampal após isquemia *in vitro*. Após 1h de isquemia e 4h de reperfusão as fatias de hipocampo foram incubadas por 30min em MTT e em seguida 30min com DMSO, os valores da redução do MTT foram determinados colorimetricamente. Os dados estão representados como a porcentagem em relação à média dos respectivos grupos controles \pm EPM. Número de animais por grupo = 6. ** $p = 0,004$, teste *t* de Student.

Discussão Parcial:

Durante os últimos 20 anos, os benefícios do exercício físico nas lesões relacionadas ao AVE têm sido demonstrado em estudos *in vivo*, onde há uma redução dos déficits neurológicos, redução do volume de infarto e edema, manutenção da integridade neurovascular e promoção da sobrevivência neuronal (Ang et al., 2003; Ding et al., 2005; Ding et al., 2006b; Endres et al., 2003; Li et al., 2004; Stummer et al., 1995). Estudos que utilizaram isquemia *in vitro*, também evidenciam menor morte e maior viabilidade celular em animais treinados em esteira (Cechetti et al., 2007; Scopel et al., 2006).

Nossos resultados corroboram a literatura sobre os efeitos benéficos do exercício físico e estão de acordo com resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, que mostraram efeito neuroprotetor em hipocampo e córtex de animais submetidos a natação durante 8 semanas (Mourão, 2010 ; Leite, 2011). O protocolo de 4 semanas de natação foi eficiente em diminuir o dano e preservar a viabilidade das células hipocâmpais após protocolo de isquemia *in vitro*, validando o exercício físico realizado como uma ferramenta para estudos em neuroproteção.

3.2. Efeito do exercício físico sobre a excitotoxicidade hipocâmpal induzida por isquemia *in vitro*

Durante um processo de isquemia seguido de reperfusão, ocorre a liberação de neurotransmissores excitatórios, em especial o glutamato, com influxo de Ca^{2+} e aumento de radicais livres, marcando a fase denominada excitotóxica (Lipton, 1999).

O conceito de excitotoxicidade foi utilizado por Olney e cols. para descrever morte celular causada por aminoácidos excitatórios (Olney, 1969). Este conceito foi elaborado a partir de evidências provindas de modelos experimentais para isquemia. A primeira delas foi a constatação de um aumento nos níveis extracelulares de glutamato durante a isquemia, e a segunda, o fato de que o bloqueio de receptores NMDA inibe os fenômenos decorrentes da descarga

glutamatérgica (Schmidt-Kastner and Freund, 1991). Seu papel na neurodegeneração hipóxica foi estabelecido na década de 80, através de estudos que mostraram sensibilidade neuronal reduzida à hipóxia, quando receptores de glutamato pós sinápticos foram bloqueados (Kass and Lipton, 1982; Rothman, 1983). A excitotoxicidade do glutamato é a principal causa de morte celular no processo de isquemia, e dá origem a uma cascata de eventos que aumenta a área de morte celular (Nishizawa, 2001).

São inúmeras as alterações fisiopatológicas desencadeadas pela isquemia cerebral. A interrupção do fluxo sanguíneo promove uma redução dos níveis de oxigênio, ocasionando uma interrupção da fosforilação oxidativa realizada na mitocôndria. Sendo assim, a glicólise anaeróbica passa a ser a fonte de adenosina trifosfato (ATP), conseqüentemente o acúmulo de lactato, íons hidrogênio e o aumento do CO₂ resultam em acidose, podendo o pH do tecido chegar próximo de 6,0 (Funahashi et al., 1994). Esta fonte de energia é insuficiente para as necessidades das células cerebrais. A depleção de ATP reduz o funcionamento das atividades dependentes de energia, como por exemplo, as bombas iônicas, o que ocorre em cerca de 4 minutos. A redução da funcionalidade da bomba de Na⁺-K⁺-ATPase resulta na perda dos gradientes iônicos transmembrânicos, o que leva à despolarização da membrana e, conseqüentemente, à abertura de canais iônicos dependentes de voltagem. O Ca²⁺, ao entrar na célula, estimula a liberação de neurotransmissores das vesículas, como o glutamato (Dugan and Choi, 1999) dando continuidade a cascata isquêmica.

Visto que, durante um processo isquêmico, a liberação excessiva de glutamato na fenda sináptica irá ativar grande número de receptores do tipo NMDA e conseqüentemente permitir influxo exagerado de Ca⁺² no terminal pós-sináptico, gerando efeitos devastadores para a célula, neste protocolo temos como objetivo investigar o efeito do exercício físico sobre a liberação de glutamato induzida por isquemia *in vitro*, como forma de inferir sobre o controle da entrada de cálcio no terminal pós-sináptico.

Hipótese: O exercício físico reduz o aumento da concentração extracelular de glutamato induzida por isquemia *in vitro*.

Metodologia:

Os animais foram sacrificados por decapitação. O cérebro, rapidamente e cuidadosamente removido, foi transferido para imersão em solução gelada (4°C) de aCSF (em mM: NaCl 125, KCl 2,5, MgCl₂ 3,0, CaCl₂ 0,1, glicose 25, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,25; pH 7,4), oxigenada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5 % CO₂). O hipocampo foi dissecado e seccionado em fatias transversais de 400µm em fatiador de tecidos do tipo “chopper” (Tissue Chopper / McIlwain™ Brinkmann Instruments, England).

As fatias do hipocampo de um mesmo animal foram aleatoriamente distribuídas em dois recipientes: (1) não sujeitas à privação oxigênio e glicose (controle) e (2) sujeitas à privação oxigênio e glicose (isquemia). Após o procedimento de isquemia (descrito no protocolo 3.1), o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -20°C, para posterior quantificação do glutamato.

A quantificação do glutamato acumulado no sobrenadante das fatias (coletado após as 4h de reperfusão), foi determinada por meio da reação enzimática descrita previamente no protocolo de liberação contínua do glutamato (aumento de fluorescência devido à produção de NADPH, na presença de GDH e NADP⁺). O *background* de fluorescência foi determinado através da leitura do NADP⁺ e do GDH junto ao tampão (KRH sem cálcio), denominamos esta mistura de mix. A determinação do glutamato de cada amostra foi realizada em triplicata, onde 10µl da amostra foram acrescentados a 185µL da solução mix. O valor do *background* foi subtraído dos valores encontrados nas amostras e para a quantificação final, utilizou-se um padrão interno de glutamato (5nmol/µl) como referência.

A leitura foi realizada em espectrofluorímetro de placa (Synergy ®), utilizando para excitação o comprimento de onda de 340 nm e para emissão comprimento de onda de 480 nm. A normalização foi realizada através da

quantificação das proteínas de cada amostra, determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976a). Os resultados foram expressos como a média \pm EPM de nmol glutamato/mg proteína ou %.

Resultados:

A concentração de glutamato liberada pelas fatias hipocâmpais, na condição controle, foi equivalente entre os dois grupos (EXE = $1,1 \pm 0,3$ nmol glutamato/mg proteína e SED = $0,65 \pm 0,3$ nmol glutamato/mg proteína, $p > 0,05$ teste *t* de Student; $n=5$).

Com o objetivo de verificar o efeito do exercício físico sobre o aumento da concentração extracelular de glutamato induzida por isquemia *in vitro*, os dados obtidos por ensaio experimental de fluorescência foram normalizados pela média do respectivo grupo controle. Como pode ser observado na figura 11, o processo isquêmico não foi capaz de alterar significativamente a liberação de glutamato no grupo exercício (controle = $100 \pm 27\%$ e isquemia = $212 \pm 56\%$; $p > 0,05$ teste *t* de Student). Adicionalmente, o exercício físico reduziu a liberação de glutamato, induzida pela isquemia (EXE = $212 \pm 56\%$ e SED = $558 \pm 115\%$, $p < 0,05$ teste *t* de Student, $n=5$).

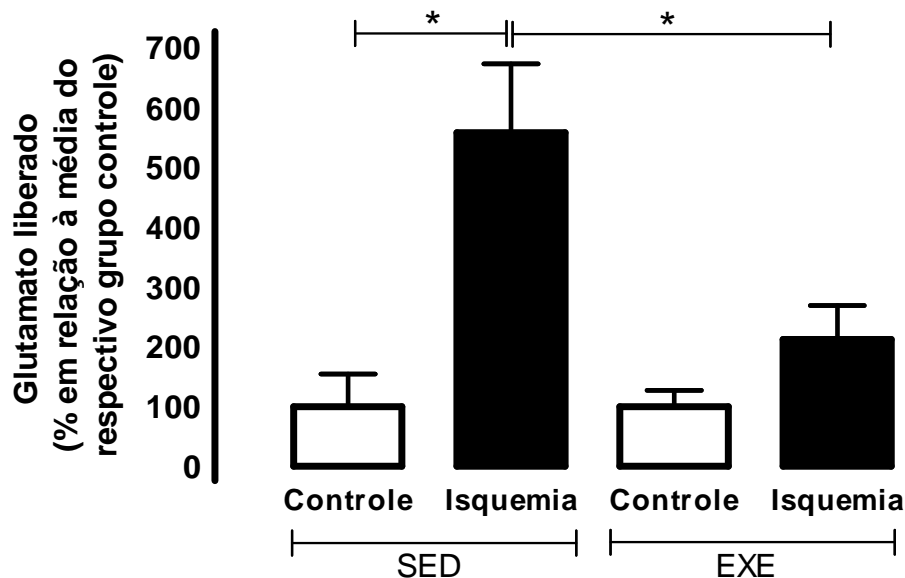


Figura 11. Efeito do exercício físico sobre a concentração extracelular de glutamato, induzida por isquemia *in vitro*. A quantificação do glutamato foi determinada pela fluorescência do NADPH após a adição de NADP e GDH ao sobrenadante coletado de fatias de hipocampo após 1h de isquemia e 4h de reperusão. O gráfico representa o glutamato acumulado, em % normalizada pela média do respectivo grupo controle. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Número de animais por grupo = 5. * $p < 0,05$ em teste *t* de Student.

Discussão parcial:

A excitotoxicidade é considerada o mecanismo predominante na morte celular em decorrência da isquemia. Assim, estratégias neuroprotetoras podem atuar diminuindo a concentração de glutamato extracelular ocasionado pela isquemia, conseqüentemente diminuindo a excitotoxicidade e a morte celular. Neste contexto, o exercício físico emerge como estratégia neuroprotetora, pois o treinamento em esteira diminui a liberação de glutamato e aumenta a liberação de GABA no estriado durante a fase aguda da isquemia/reperusão tecidual. (Jia et al., 2009; Zhang et al., 2010). Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa observaram também diminuição na liberação hipocampal de glutamato, em animais treinados em natação durante 8 semanas quando submetidos a isquemia *in vitro* (Mourão, 2010; Leite, 2011). Nossos resultados demonstram que mesmo o protocolo de menor duração (4 semanas) foi capaz de diminuir a

liberação de glutamato de fatias hipocâmpais de animais EXE submetidas a isquemia *in vitro*, diminuindo, possivelmente, o dano excitotóxico mediado pelo glutamato.

A hipótese da neurotoxicidade do glutamato- Ca^{2+} dependente propõe que a excessiva concentração de glutamato causa uma perturbação na homeostase do Ca^{2+} , levando a uma elevação patológica na concentração interna deste íon, o qual ativa processos cálcio-dependentes que levam à morte celular (Choi et al., 1988). Desta forma podemos sugerir que a diminuição da concentração extracelular de glutamato, observada nos animais EXE, contribui para a manutenção da homeostase intracelular de Ca^{2+} , impedindo a morte celular em decorrência da sua elevação.

2.3. Efeito do exercício físico sobre a função mitocondrial hipocâmpal

As mitocôndrias estão presentes em quase todas as células eucarióticas vegetais e animais. Nos neurônios, estão localizadas no corpo, axônio, dendritos e terminal sináptico. São as organelas responsáveis pela conversão da energia de óxido-redução em ATP, energia química necessária para a manutenção dos processos celulares (Nicholls and Ferguson, 2002).

As mitocôndrias têm dimensões da ordem de grandeza de 1 μm , e estruturalmente são constituídas por duas membranas e dois compartimentos por elas limitados. O compartimento mais interno é a matriz mitocondrial, que contém enzimas do ciclo de Krebs e da β -oxidação de ácidos graxos. O segundo compartimento, cujo volume é diminuto, é o chamado espaço intermembranar, localizado entre as membranas mitocondriais interna e externa. A membrana mitocondrial externa contém proteínas chamadas “porinas”, que atuam como poros não-específicos para solutos de peso molecular menor que 10 kDa, com tamanhos que variam entre 2,5 – 3,0 nm, pelos quais passam livremente a água e solutos de baixo peso molecular (Cesar Mde and Wilson, 2004).

A membrana mitocondrial interna apresenta invaginações formando as cristas mitocondriais e é altamente seletiva, sendo permeável apenas para o O₂, CO₂, NO• e H₂O. Nesta membrana, encontram-se os componentes enzimáticos da cadeia respiratória, bem como, os transportadores específicos para o ATP, ADP, piruvato, Ca²⁺ e fosfatos (Nicholls and Ferguson, 2002).

A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém do potencial eletroquímico de prótons, gerado pela cadeia de transporte de elétrons, que reduz o O₂ formando H₂O. Esta energia é utilizada pela ATP-sintase para fosforilar ADP à ATP. Assim, é a cadeia respiratória que controla a energia redox necessária para gerar este potencial de membrana mitocondrial e promover a fosforilação oxidativa (Lehninger al., 1995).

Os elétrons provenientes das coenzimas NADH, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos à NADH desidrogenase (complexo I). O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (CoQ), gerando a forma reduzida desta coenzima (UQH₂). Elétrons originados a partir do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando também na redução da coenzima Q. Em alguns tecidos, a coenzima Q pode também ser reduzida pela glicerol-3-fosfato desidrogenase (na presença de glicerol-3-fosfato citosólico) ou pela ubiquinona oxiredutase (como resultado da β-oxidação de ácidos graxos). A UQH₂ é então desprotonada, resultando na formação da espécie aniônica semiquinona (UQH•), a forma que doa elétrons ao citocromo C. Existem dois conjuntos separados de UQH•, um na face citoplasmática e outro na face matricial da membrana mitocondrial interna, e as duas formas de UQH• são oxidadas juntas, regenerando UQ e doando elétrons para o citocromo C. O citocromo C transfere elétrons à citocromo oxidase (complexo IV). Este complexo é responsável pela transferência de elétrons para o oxigênio, resultando na geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de elétrons (Nicholls and Ferguson, 2002).

O fluxo de H⁺ através da ATP-sintase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente, estaria diretamente acoplado à produção de

ATP, a partir da fosforilação do ADP por Pi. A ATP-sintase, responsável por esta reação, é uma enzima cuja composição varia um pouco de espécie para espécie, contém 16 proteínas diferentes e é constituída de duas regiões bem distintas denominadas: F1, solúvel e localizada na matriz mitocondrial e região Fo, hidrofóbica e mergulhada na membrana mitocondrial interna, onde estão também localizados os complexos da cadeia respiratória (Lutter et al., 1993).

Durante a segunda metade do século XX, a mitocôndria era considerada uma organela cuja função se restringia à transformação de energia através da fosforilação oxidativa. Contudo, cerca de uma década atrás, ficou claro que a mitocôndria contribuía com uma segunda função crucial: o controle da morte celular (Kroemer et al., 2007).

Os neurônios morrem por diversos processos. Dentre eles, dependendo da natureza e da severidade do estímulo, estão a necrose e a apoptose. Elas podem acontecer em paralelo e tem a mitocôndria como peça central (Nagley et al., 2010). Quando a mitocôndria é exposta a altas concentrações de Ca^{2+} , especialmente quando esta é acompanhada por estresse oxidativo e depleção de ATP, ela torna-se inchada e perde seu potencial de membrana. Isto ocorre como resultado da abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (PPT). Se este poro permanece por muito tempo aberto, a célula não consegue manter seus níveis de ATP e então morre por necrose (Halestrap, 2006).

A apoptose é um mecanismo pré-determinado, que pode ocorrer através de várias cascatas de sinalização, as quais podem ser divididas em via extrínseca e via intrínseca. A apoptose pela via extrínseca é caracterizada pela ativação de receptores de membrana localizados na superfície celular, enquanto a apoptose pela via intrínseca é resultado de cascatas de eventos intracelulares, nas quais a permeabilização da membrana mitocondrial tem um papel fundamental (Kroemer and Martin, 2005; Nakagawa et al., 2005; Saelens et al., 2005).

A permeabilidade transitória mitocondrial (PTM) é caracterizada por permeabilização não-seletiva da membrana interna da mitocôndria, promovida pelo estresse oxidativo (acúmulo de EROs – espécies reativas de oxigênio) e pelo acúmulo do íon Ca^{2+} , em um processo estimulado por vários compostos e

por várias condições (Gunter et al., 2004; Kowaltowski et al., 2001). O Ca^{2+} é considerado o elemento chave nos fenômenos de morte celular por necrose e apoptose, por ser necessário para a indução de PTM (Kowaltowski et al., 2001), por modular fatores de transcrição, quinases e fosfatases, e por ativar enzimas envolvidas na degradação protéica e no metabolismo de fosfolipídios (Penzo et al., 2004). O nome “permeabilidade transitória” é utilizado devido à observação de que a permeabilização mitocondrial, nesta situação, pode ser parcialmente revertida pela adição de quelantes de Ca^{2+} ou redutores ditiólicos logo após a permeabilização (Castilho et al., 1996; Hunter and Haworth, 1979; Valle et al., 1993).

Portanto, além de causar necrose, a PTM pode levar à apoptose, uma vez que essas organelas liberam proteínas envolvidas nesse processo, como o citocromo C, fatores indutores de apoptose e pró-caspases (Liu et al., 1996; Susin et al., 1999; Zhivotovsky et al., 1999).

Visto que, a mitocôndria exerce função importante sobre o controle homeostático do cálcio e o controle da morte celular, captando cálcio para o seu interior e controlando a abertura do PPT, principalmente sob condições patológicas em que ocorre grande fluxo de cálcio para o interior da célula, como em casos de processos isquêmicos; e diante da observação do efeito neuroprotetor do exercício físico em processo de isquemia *in vitro*, o objetivo deste protocolo foi avaliar a capacidade funcional de mitocôndrias hipocâmpais de animais EXE em tamponar o cálcio citosólico livre.

Hipótese: os animais do grupo exercício apresentam maior eficiência na manutenção da homeostase do cálcio mediada pela mitocôndria, apresentando maior capacidade de retenção de cálcio (CRC) e maior resistência para abertura do poro de permeabilidade transitória (PPT).

Metodologia:

• Isolamento das mitocôndrias hipocâmpais

Os animais foram sacrificados por decapitação, o cérebro rapidamente e cuidadosamente removido e os hipocâmpos dissecados. Para o isolamento das mitocôndrias foi utilizado o método de centrifugação diferencial descrito por Rosenthal e cols. (1987), com algumas modificações. Os hipocâmpos foram colocados num recipiente com 5 mL de meio de isolamento contendo: manitol 225 mM, sacarose 75 mM, EGTA-K⁺ 1 mM, BSA 0,1% e HEPES-K⁺ 10 mM (pH 7,4). Foram cortados em pequenos pedaços e extensivamente lavados. Estes fragmentos foram homogeneizados manualmente por 10 vezes com movimentos “up and down” em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, contendo 5 mL de meio de isolamento e mantido no gelo, para provocar a lise celular e obtenção de uma suspensão homogênea (Rosenthal et al., 1987).

A suspensão foi centrifugada por 3 min a 2.000 g para precipitação de núcleos e resíduos celulares. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi novamente centrifugado por 8 minutos a 12.000 g. O precipitado resultante foi ressuspenso em 5 mL do mesmo meio, com adição de 10 µL de digitonina 10% e centrifugado durante 10 minutos a 12.000 g. O sobrenadante e o precipitado mais externo e superior (parte clara) foram descartados, e apenas o precipitado central (escuro) foi ressuspenso em meio de manitol 225 mM, sacarose 75 mM e HEPES-K⁺ 10 mM pH 7,4 e novamente centrifugado a 12.000 g por 10 min. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. O p precipitado foi mantido em gelo até o momento da leitura.

As concentrações de proteínas das suspensões mitocondriais foram determinadas pelo método de Biureto (Gornall et al., 1949), na presença de colato 0,2%. O princípio do método baseia-se na formação de ligações peptídicas com íons cúpricos, em meio alcalino, dando origem a um complexo com tonalidade violeta, quantificado a 540 nm em espectrofotômetro. A absorvância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada. Uma solução de BSA a 1% foi utilizada como padrão. A

concentração de proteínas das suspensões mitocondriais foi de aproximadamente 25 - 35 mg × mL⁻¹.

• **Avaliação da integridade mitocondrial através do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$)**

A captação de safranina foi utilizada como indicador do potencial de membrana mitocondrial. A safranina é um corante carregado positivamente, e apresenta características espectrais que variam em função de sua concentração. Estas resultam da agregação da safranina do lado da matriz mitocondrial. A agregação se deve à associação dos radicais positivos da safranina com poliânions ou sítios aniônicos, localizados na porção hidrofóbica da membrana interna. Portanto, sob a influência do $\Delta\Psi$ obtido pela oxidação de substratos ou pela hidrólise de ATP, a safranina move-se do lado externo para o lado interno da membrana interna (matriz). Esta propriedade é útil para medir o estado energizado em mitocôndrias e as variações na fluorescência podem ser usadas como medida do potencial de membrana (Zanotti and Azzone, 1980).

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado fluorimetricamente (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Japão) através da safranina (2,5 μ M) no meio extramitocondrial, em tampão contendo 130mM KCL, 2mM KH₂PO₄, 20mM HEPES, 5mM malato, 5mM glutamato e EGTA 15 μ M.

Para a observação da capacidade fosforilativa, adiciona-se ADP (200 μ M). Este estado de fosforilação é revertido pela oligomicina (1 μ g/ml) que impede a oxidação de nutrientes e o consumo de oxigênio. Por fim, adiciona-se FCCP (2 μ M), um desacoplador mitocondrial que causa a dissipação do potencial de membrana. O potencial foi monitorado continuamente a 37⁰C, com agitação constante do meio de incubação. Para leitura de fluorescência foram usados os comprimentos de onda Ex = 495 nm e Em = 586 nm.

• **Avaliação da CRC e abertura do PPT mitocondrial**

As mitocôndrias (0,25mg/ml) foram ressuspensas em meio de reação contendo 130mM KCL, 2mM MgCl₂, 2mM KH₂PO₄, 20mM HEPES, 5mM malato,

5mM glutamato, 1µg/ml oligomicina e 25µM ADP. A determinação da CRC pelas mitocôndrias do hipocampo foi avaliada fluorimetricamente em espectrofluorímetro (Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Japão) utilizando-se a sonda calcium green-5N a 0,5µM (sigma, USA). O cálcio extra mitocondrial foi monitorado usando filtros de 485/20nm para excitação e 533/25nm para emissão. Pulsos de 5µM CaCl₂ foram adicionados em intervalos de 90s, a temperatura foi mantida a 37°C e a agitação permaneceu constante (Schinzel et al., 2005; Wang et al., 2009). Para avaliação do efeito do exercício físico na modulação do PPT, a CRC também foi avaliada na presença de Ciclosporina A (CsA), um inibidor da abertura do PPT altamente específico (Fournier et al., 1987).

Logo que o cálcio é adicionado, observa-se um aumento na fluorescência que é seguido por uma queda. A queda acontece porque o cálcio é captado para o interior da mitocôndria e a sonda não o acompanha, desconectando-se do íon e, portanto deixando de emitir a fluorescência.

O ponto em que as mitocôndrias captaram menos que 70% do cálcio adicionado ou onde observou-se um ponto de inflexão foi considerado o momento no qual a mitocôndria perdeu a sua capacidade de captar mais Ca²⁺. A concentração de cálcio captada pelas mitocôndrias foi determinada pela quantidade de pulsos por ela suportados, multiplicada por 5 (5µM cada pulso de Ca²⁺), dividida pela quantidade de mitocôndrias adicionadas (0,25mg/ml).

Para avaliar a dinâmica da abertura do PPT e a liberação do conteúdo de cálcio do interior mitocondrial, a latência e a inclinação do último traçado foram quantificadas. A latência, ou seja, o início da abertura do poro, foi considerada o momento no qual um ponto de inflexão foi identificado. A quantificação da inclinação foi realizada como forma de inferir sobre a velocidade de liberação do cálcio através do PPT. Para determinar a inclinação, a regressão linear do ponto de inflexão até o ponto final do traçado foi realizada, a equação da reta foi obtida e o coeficiente angular determinado e utilizado como parâmetro quantitativo da inclinação.

Resultados:

O monitoramento da fluorescência da safranina foi utilizado como controle da viabilidade mitocondrial. Uma análise qualitativa (4 animais por grupo) do potencial de membrana mitocondrial (figura 12), demonstrou alterações na fluorescência da safranina, com as adições utilizadas (indicadas nas figuras). A adição das mitocôndrias ao meio de reação causa a entrada de safranina, a qual se adsorve nas membranas de mitocôndrias energizadas, diminuindo a quantidade de fluorescência emitida. O FCCP, protonóforo que leva a eliminação de $\Delta\Psi_m$, causa liberação da safranina das mitocôndrias e aumento brusco na fluorescência. Além disso, as alterações observadas com a adição de ADP e oligomicina indicam capacidade de fosforilação preservadas. Visto isso, a análise qualitativa dos traçados revelou integridade das mitocôndrias isoladas utilizadas nos experimentos.

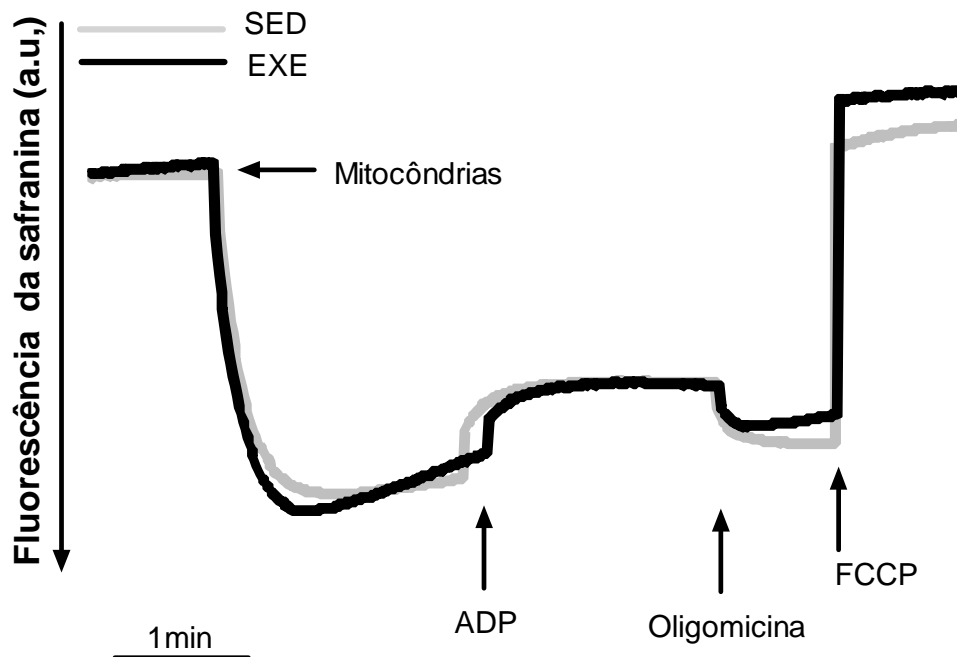


Figura 12. Potencial de membrana das mitocôndrias hipocâmpais. A fluorescência da safranina foi utilizada para monitorar o potencial de membrana mitocondrial. O registro foi realizado durante 420 segundos. Mitocôndrias (0,25mg/ml), ADP (200 μ M), oligomicina (1mg/ml) e FCCP (2mM) foram adicionados nos locais indicados pelas setas.

Como mostra a figura 13, não foram observadas diferenças na CRC entre as mitocôndrias dos dois grupos (SED: 62 ± 8 nM/mg proteína e EXE: 75 ± 9 nM/mg proteína, $p > 0,05$; teste *t* de Student). Além disso, a adição de CsA ao meio de reação foi capaz de retardar a abertura do PPT mitocondrial aumentando a CRC em ambos os grupos, porém não houveram diferenças entre seus valores (SED: 128 ± 15 nM/mg proteína e EXE: 120 ± 9 nM/mg proteína, $p > 0,05$ teste *t* de Student). A normalização dos valores da CRC na presença de CsA (CRC-CsA) pelo seu respectivo controle de CRC (CRC-CsA/CRC), também não revelou diferenças entre os grupos (SED: $2,14 \pm 0,24$ e EXE: $1,6 \pm 0,12$; $p = 0,1$ teste *t* de Student; figura 13D).

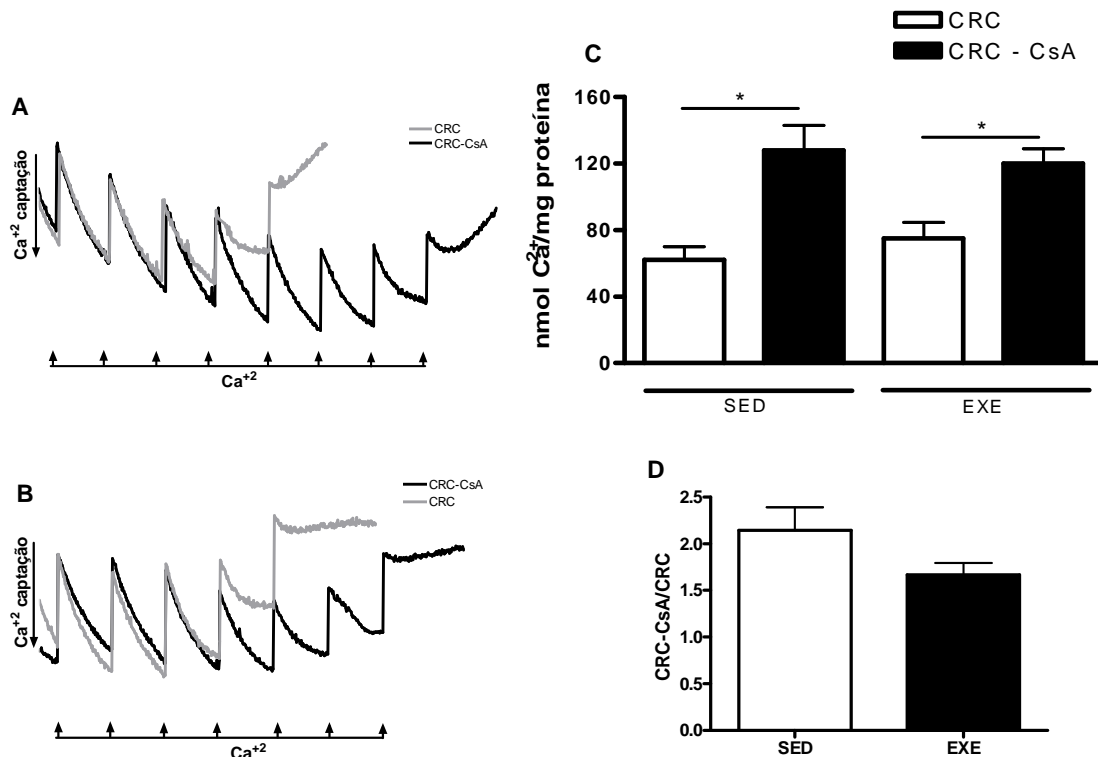


Figura 13. Capacidade de retenção de cálcio (CRC) mitocondrial. Mitocôndrias isoladas (0,25mg/ml) foram incubadas em meio de reação na presença de $0,5\mu\text{M}$ de calcium green-5N. Os registros identificados com CsA foram realizados na presença de ciclosporina A ($1\mu\text{M}$). Pulsos de cálcio ($\text{CaCl}_2 - 5\mu\text{M}$, indicados pelas setas nos gráficos de linha) foram adicionados a cada 90s. **(A, B)** Traçados representativos dos registros de captação de cálcio mitocondrial em animais sedentários e exercício, respectivamente. **(C)** Capacidade máxima de retenção de cálcio na presença (CRC-CsA) e na ausência (CRC) de CsA. Os dados estão representados como média \pm EPM. **(D)** Razão entre a

CRC na presença (CRC-CsA) e na ausência (CRC) de CsA.* $p < 0,05$ em teste t de Student.

A avaliação da dinâmica revelou retardo na abertura do PPT mitocondrial dos animais EXE, apresentando um aumento de aproximadamente 55% na latência deste grupo (SED: $30,8 \pm 6,7$ s; $n=5$ e EXE: 48 ± 3 s; $n=6$; $p < 0,05$ teste t de Student; figura 14A). Contudo, os valores para a inclinação (figura 14B) não foram diferentes entre os dois grupos (SED: $0,106 \pm 0,029$; $n=5$ e EXE: $0,06 \pm 0,021$; $n=6$; $p > 0,05$ teste t de Student).

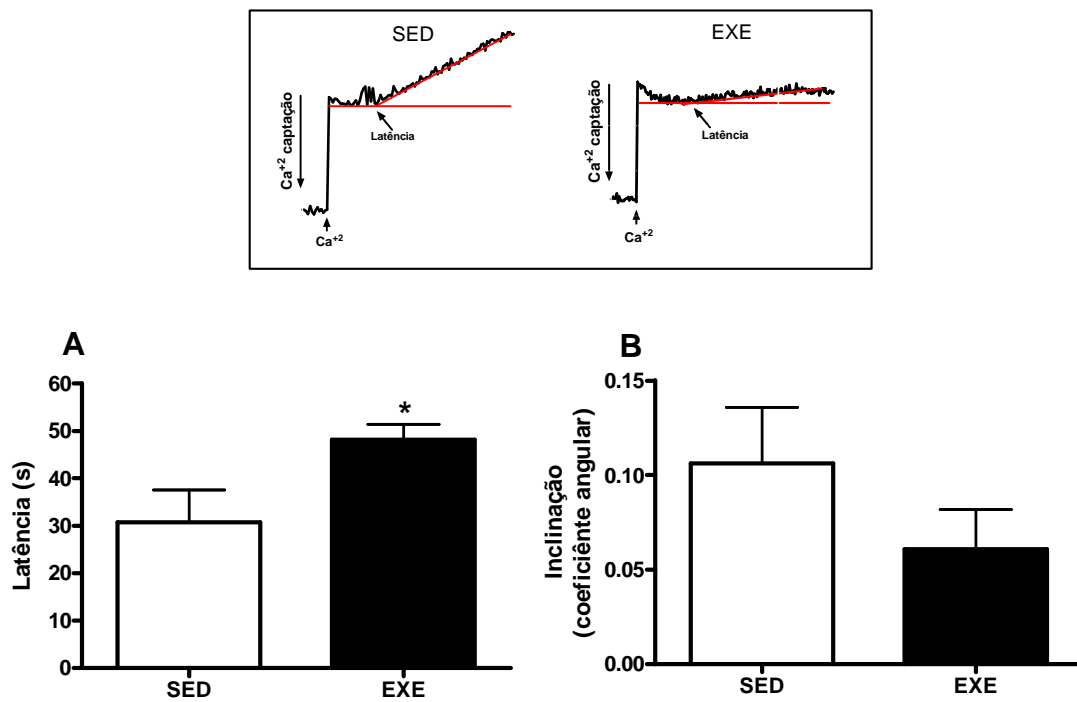


Figura 14. Avaliação da dinâmica do PPT mitocondrial. A latência e a inclinação do último pulso da CRC foram avaliadas. No detalhe da figura, estão traços representativos do último pulso de um animal sedentário (SED) e de exercício (EXE). As setas indicam o ponto de latência considerados, as linhas vermelhas formam a angulação avaliada **(A)** Ponto de latência, em segundos, para a abertura do PPT **(B)** Inclinação da reta, para inferir sobre a velocidade de liberação do cálcio. Os dados estão representados como média \pm EPM.* $p < 0,05$ em teste t de Student.

Discussão parcial:

A abertura do PPT mitocondrial é um mediador importante para a morte celular em processos isquêmicos. Muitas estratégias parecem diminuir a morte celular por isquemia por aumentar a CRC, aumentar o limiar para a abertura do PPT e reduzir a liberação excessiva de cálcio do interior da mitocôndria para o citosol (Schinzel et al., 2005; Wang et al., 2009).

Para investigarmos se o exercício físico é uma das estratégias que provoca alterações mitocondriais que possam contribuir para o fenômeno de neuroproteção, foram realizados experimentos *in vitro*, com mitocôndrias hipocâmpais isoladas. Os resultados demonstraram não haver diferença na CRC entre os dois grupos. Além disso, a CsA apresentou mesma eficiência na inibição do PPT para os dois grupos. Estes resultados sugerem não haver efeito positivo do exercício físico sobre o controle homeostático do cálcio pela mitocôndria, não contribuindo para os efeitos neuroprotetores promovidos pelo exercício.

Entretanto, a avaliação da dinâmica de abertura do poro demonstrou que os animais EXE levam mais tempo para abrirem o PPT, este retardo sugere, apesar do resultado anterior não indicar aumento na CRC, que os animais EXE passaram mais tempo captando Ca^{2+} e podem apresentar aumento na CRC. Experimentos diminuindo a concentração dos pulsos de Ca^{2+} podem ajudar a comprovar esta hipótese. Quanto a avaliação da inclinação, um cálculo amostral revelou que a amostra foi insuficiente para a conclusão da análise deste parâmetro. Um aumento em 3 animais seria suficiente para uma conclusão mais rigorosa.

Nossos resultados sugerem que, apesar de não exercer efeito neuroprotetor, por aumentar sua capacidade de reter cálcio em situações prejudiciais, as mitocôndrias de animais EXE podem contribuir para o fenômeno de neuroproteção por apresentarem maior resistência para abrir o PPT e liberar o cálcio e fatores apoptóticos presentes no interior das mitocôndrias. No entanto, novos experimentos são necessários para comprovar esta hipótese.

Contudo, dados importantes de nosso grupo de pesquisa corroboram esta ideia. A realização prévia do protocolo de exercício de natação, por 8 semanas, reduziu a liberação de Fator Indutor de Apoptose (AIF), após o insulto isquêmico (Mourão, 2010). Em condições fisiológicas, o AIF permanece confinado à membrana mitocondrial interna (Otera et al., 2005). Através de insultos e consequente permeabilização patológica da membrana mitocondrial, o AIF é liberado para o citosol, translocando-se para o núcleo, gerando uma fragmentação do DNA em larga escala (Otera et al., 2005; Susin et al., 1999).

2.4. Avaliação do efeito do exercício físico sobre a expressão de proteínas que compõem o PPT mitocondrial

Apesar do grande número de investigações científicas, a natureza das alterações de membrana que levam a PPT ainda permanece em debate, mas claramente envolve proteínas de membrana (He and Lemasters, 2002). Possíveis componentes seriam: o transportador de nucleotídeos de adenina (ANT), o canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), a ciclofilina D (CypD), a hexoquinase, a creatina quinase e o receptor benzodiazepínico (Halestrap et al., 2002). Alterações na expressão destas proteínas estão correlacionadas à susceptibilidade de abertura do PPT.

Uma vez que os resultados do protocolo anterior indicaram alteração na dinâmica de abertura do PPT, o objetivo deste protocolo foi avaliar a expressão de proteínas que o compõem.

Hipótese: Os animais do grupo EXE apresentam diminuição na expressão de proteínas que compõem o PPT, como a CyD e o ANT.

Metodologia:

•Imunoblot

As mitocôndrias foram isoladas com metodologia padrão de centrifugação segundo Wang e cols. (Wang et al., 2003). Resumindo, os animais foram decapitados e ambos os hipocampos foram dissecados. O tecido foi cuidadosamente homogeneizado manualmente em 1,5ml de tampão de isolamento gelado (225 nM mannitol, 75 mM sacarose e 5mM hepes, 7.4pH), centrifugado a 800g em 4°C por 10min; o sobrenadante centrifugado novamente a 9200g por 15min. O precipitado foi ressuscitado em tampão de isolamento (50µl). A concentração de proteínas da suspensão mitocondrial foi determinada pelo método colorimétrico de Bradford (1976) e as amostras foram armazenadas em freezer -80 °C (Bradford, 1976b).

Oitenta µg de proteínas da amostra de mitocôndrias isoladas foram aplicadas em gel (12%) de poliacrilamida, com dodecil sulfato de sódio (SDS). O processo de eletroforese ocorreu a 100V, por aproximadamente 3h, a transferência para a membrana de PVDF foi realizada a 80V por 90min e a membrana foi bloqueado por 1h em leite 5%, antes da imunização.

A membrana foi então incubada “*overnight*” a 4°C, sob agitação, com anticorpo primário CypD (17 kDa, 1:1000), ANT(33 kDa, 1:200) e o controle endógeno COX4 (18 kDa, 1:200), todos da Santa Cruz, Biotechnology, USA. A incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Anti-mouse; 1:2000) foi realizada por 1 hora. As espécies imunoreativas foram visualizadas pelo processo de quimiluminescência, utilizando kit luminol-peroxidase (relação 1:1- Millipore, USA)

As bandas imuno-reativas foram quantificadas por densitometria utilizando o programa Image J, (National Institute of Health, USA). Os resultados foram expressos como média ±EPM da relação CypD/COx4 ou ANT/COx4 em unidades de densidade relativas.

Resultados:

Um efeito significativo do protocolo de exercício foi observado sobre a expressão de CypD no isolado de mitocôndrias hipocampais, apresentando uma diminuição de aproximadamente 50% (SED: $0,85 \pm 0,18$ $n=3$ e EXE: $0,43 \pm 0,06$, $n=4$; $p < 0,05$ teste t de Student, figura 15 C) . Contudo, nenhuma alteração foi observada na expressão de ANT (SED: $0,81 \pm 0,22$ $n=4$ e EXE: $0,87 \pm 0,26$ $n=4$; $p > 0,05$; teste t de Student, figura 15D).

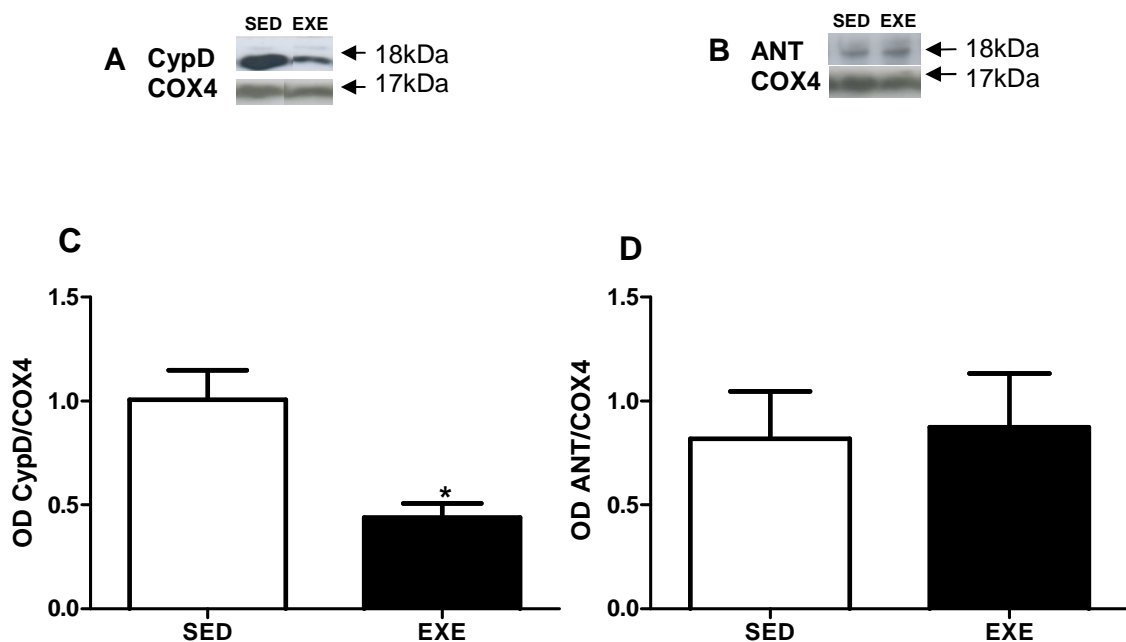


Figura 15. Efeito do exercício físico sobre a expressão de proteínas que compõem o PPT mitocondrial. A expressão de CypD e ANT foi avaliada por imunoblot de mitocôndrias hipocampais isoladas. (A,B) Figuras representativas do imunoblot de animais SED e EXE, respectivamente (C,D) análise densitométrica para CypD (SED: $0,85 \pm 0,18$ $n=3$ e EXE: $0,43 \pm 0,06$ $n=4$) e ANT (SED: $0,81 \pm 0,22$ e EXE: $0,87 \pm 0,26$ $n=4$). Como controle endógeno foi utilizada a expressão de COX4. Os dados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ teste t de Student.

Discussão parcial:

O poro é formado pelo contato entre proteínas da membrana externa e interna da mitocôndria que são principalmente: canal aniônico dependente de voltagem (VDAC), transportador de nucleotídeos de adenina (ANT) e ciclofilina D

(CypD)) (Crompton et al., 1998; Halestrap et al., 1997; Woodfield et al., 1998). Estes processos são catalisados pela CypD que está localizada na matriz mitocondrial. A sensibilidade desta organela em realizar a abertura do poro induzida pelo cálcio é dependente da quantidade de CypD expressa (Brustovetsky et al., 2003). Desta forma, a diminuição da expressão de proteínas que formam o poro, poderia diminuir a probabilidade de abertura, retardando ou até mesmo impedindo os efeitos deletérios causados por este evento. Apesar de não haver diferença na expressão de ANT, nossos resultados indicam uma diminuição na expressão de CypD nos animais EXE, sendo esta diminuição um provável mecanismo que contribui para o efeito neuroprotetor do exercício físico.

5. DISCUSSÃO GERAL

Historicamente, a realização regular de exercício físico sempre esteve associada com a imagem de pessoas saudáveis. As pesquisas indicam que os benefícios relacionados à prática do exercício físico independem da modalidade, desde que sejam regulares e livre de estresse (Grace et al., 2009).

Além de garantir a saúde, o exercício tem sido reconhecido como estratégia comportamental, com grande capacidade de tratar e prevenir distúrbios neurológicos (Ang et al., 2003; Ding et al., 2005; Ding et al., 2006b; Endres et al., 2003; Li et al., 2004; Stummer et al., 1995). Neste contexto, nossos resultados corroboram a literatura indicando melhora no processo de memória e neuroproteção nos animais submetidos a exercício físico.

O desafio das pesquisas atuais está em elucidar os mecanismos pelos quais uma intervenção simples, como o exercício, modula processos complexos do SNC. Um alvo promissor para o estudo das adaptações geradas pelo exercício é o Ca^{2+} , pois suas funções estão intimamente ligadas aos mecanismos moleculares de memória e morte neuronal.

Neste sentido, nossos resultados avançam para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do exercício físico, permitindo uma melhor adequação como estratégia terapêutica.

De forma abrangente, os animais submetidos ao exercício físico de natação apresentaram maior habilidade em liberar o neurotransmissor glutamato, de seus terminais pré-sinápticos hipocâmpais. Os resultados indicam que a potenciação da sinalização de cálcio no terminal pré-sináptico colabora para este aumento da liberação de glutamato. Visto que, entre os mecanismos moleculares propostos para explicar os processos de memória, encontra-se o aumento na capacidade de liberar neurotransmissores (Bliss and Collingridge, 1993). Pode-se sugerir que, a melhora do desempenho de memória espacial em animais do grupo exercício seja decorrente de alterações plásticas pré-sinápticas, relacionadas ao aumento da sinalização de cálcio e consequente elevação na quantidade de glutamato liberado.

Outro tema abordado neste estudo foi a contribuição da homeostase intracelular do cálcio para a neuroproteção modulada pelo exercício físico. A menor concentração de glutamato extracelular, após isquemia *in vitro* nas fatias hipocâmpais de animais do grupo exercício, pode contribuir para a neuroproteção, reduzindo o influxo de Ca^{2+} no terminal pós-sináptico e consequentemente diminuindo os efeitos deletérios causados por seu influxo excessivo. Esta redução na concentração de glutamato extracelular pode ocorrer devido à diminuição na liberação ou devido ao aumento de recaptação de glutamato pelos astrócitos (Danbolt, 2001).

Devido a grande importância da mitocôndria no controle homeostático do Ca^{2+} durante processos isquêmicos (Halestrap, 2006), o efeito do exercício físico sobre a homeostase do Ca^{2+} promovida pela mitocôndria, também foi avaliada. Embora não tenham sido observadas alterações na CRC, um aumento na latência para a abertura do PPT e uma redução tão significativa da expressão de CypD, indicam função mitocondrial diferenciada no hipocampo de animais do grupo exercício. Protocolos experimentais devem ser delineados para melhor compreensão do sentido fisiológico destas alterações.

6. CONCLUSÕES

O exercício físico:

- melhorou o desempenho em tarefa de reconhecimento espacial de objeto, não alterando o desempenho em tarefa de reconhecimento de novo objeto;

- aumentou a liberação de glutamato vesicular, dependente de cálcio, em sinaptossomas hipocampais, quando estimulados com KCL, porém não modificou a liberação de glutamato citosólico, independente de cálcio, quando estimulados com veratridina;

- aumentou a concentração basal e a entrada de cálcio em sinaptossomas hipocampais, quando despolarizados com KCL;

- apresentou aumento da liberação de glutamato de sinaptossomas hipocampais na presença de quelante externo e igualou a quantidade de glutamato liberado quando despolarizados com KCL, em presença de quelante interno de cálcio e bloqueadores de canais de cálcio dependentes de voltagem;

- apresentou efeito neuroprotetor, diminuindo o dano e mantendo a viabilidade de células hipocampais após isquemia in vitro;

- diminuiu a liberação de glutamato em fatias hipocampais submetidas à isquemia in vitro;

- não alterou a capacidade de retenção de cálcio por mitocôndrias hipocampais isoladas;

- aumentou a latência para a abertura do PPT;

- diminuiu a expressão de ciclofilina D, porém não alterou a expressão de ANT em mitocôndrias hipocampais isoladas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albeck, D.S., Sano, K., Prewitt, G.E., Dalton, L., 2006. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behav Brain Res.* 168, 345-8.
- Almeida, P.W., Gomes-Filho, A., Ferreira, A.J., Rodrigues, C.E., Dias-Peixoto, M.F., Russo, R.C., Teixeira, M.M., Cassali, G.D., Ferreira, E., Santos, I.C., Garcia, A.M., Silami-Garcia, E., Wisloff, U., Pussieldi, G.A., 2009. Swim training suppresses tumor growth in mice. *J Appl Physiol.* 107, 261-5.
- Ang, E.T., Wong, P.T., Moochhala, S., Ng, Y.K., 2003. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience.* 118, 335-45.
- Ang, E.T., Dawe, G.S., Wong, P.T., Moochhala, S., Ng, Y.K., 2006. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res.* 1113, 186-93.
- Arida, R.M., Scorza, C.A., da Silva, A.V., Scorza, F.A., Cavalheiro, E.A., 2004. Differential effects of spontaneous versus forced exercise in rats on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation. *Neurosci Lett.* 364, 135-8.
- Arundine, M., Tymianski, M., 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium.* 34, 325-37.
- Auer, R.N., 1998. Insulin, blood glucose levels, and ischemic brain damage. *Neurology.* 51, S39-43.
- Bahr, B.A., Parsons, S.M., 1992. Purification of the vesamicol receptor. *Biochemistry.* 31, 5763-5769.
- Baker, M.A., Horvath, S.M., 1964. Influence of Water Temperature on Oxygen Uptake by Swimming Rats. *J Appl Physiol.* 19, 1215-8.
- Barth, A., Barth, L., Newell, D.W., 1996. Combination therapy with MK-801 and alpha-phenyl-tert-butyl-nitron enhances protection against ischemic neuronal damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Exp Neurol.* 141, 330-6.
- Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Fremeau, R.T., Edwards, R.H., 2000. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science.* 289, 957.
- Betz, H., 1990. Homology and analogy in transmembrane channel design: lessons from synaptic membrane proteins. *Biochemistry.* 29, 3591-3599.
- Bicalho, A.F., Guatimosim, C., Prado, M.A., Gomez, M.V., Romano-Silva, M.A., 2002. Investigation of the modulation of glutamate release by sodium channels using neurotoxins. *Neuroscience.* 113, 115-23.
- Bliss, T.V.P., Lømo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology.* 232, 331.
- Bliss, T.V.P., Collingridge, G.L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361, 31-39.

- Bradford, H., Ward, H., Thomas, A., 1978. Glutamine—a major substrate for nerve endings. *Journal of Neurochemistry*. 30, 1453-1459.
- Bradford, M., 1976a. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Bradford, M.M., 1976b. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-54.
- Brown, B.S., Van Huss, W., 1973. Exercise and rat brain catecholamines. *J Appl Physiol*. 34, 664-9.
- Brown, B.S., Payne, T., Kim, C., Moore, G., Krebs, P., Martin, W., 1979. Chronic response of rat brain norepinephrine and serotonin levels to endurance training. *J Appl Physiol*. 46, 19-23.
- Brown, M.M., 2002. Brain attack: a new approach to stroke. *Clin.Med*. 2, 60-65.
- Brustovetsky, N., Brustovetsky, T., Purl, K.J., Capano, M., Crompton, M., Dubinsky, J.M., 2003. Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition. *J Neurosci*. 23, 4858-67.
- Buckley, K., Kelly, R.B., 1985. Identification of a transmembrane glycoprotein specific for secretory vesicles of neural and endocrine cells. *The Journal of cell biology*. 100, 1284.
- Burghardt, P.R., Fulk, L.J., Hand, G.A., Wilson, M.A., 2004. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res*. 1019, 84-96.
- Carmeliet, E., 2004. Intracellular Ca(2+) concentration and rate adaptation of the cardiac action potential. *Cell Calcium*. 35, 557-73.
- Carro, E., Trejo, J., Busiguina, S., Torres-Aleman, I., 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *Journal of Neuroscience*. 21, 5678.
- Casey, E., Mistry, D.J., MacKnight, J.M., 2005. Training room management of medical conditions: sports gastroenterology. *Clin Sports Med*. 24, 525-40, viii.
- Caspersen, C.J., Powell, K.E., Christenson, G.M., 1985. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep*. 100, 126-31.
- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1996. The irreversibility of inner mitochondrial membrane permeabilization by Ca²⁺ plus prooxidants is determined by the extent of membrane protein thiol cross-linking. *J Bioenerg Biomembr*. 28, 523-9.
- Catterall, W.A., Few, A.P., 2008. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron*. 59, 882-901.
- Cechetti, F., Rhod, A., Simao, F., Santin, K., Salbego, C., Netto, C.A., Siqueira, I.R., 2007. Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res*. 1157, 121-5.
- Cesar Mde, C., Wilson, J.E., 2004. All three isoforms of the voltage-dependent anion channel (VDAC1, VDAC2, and VDAC3) are present in mitochondria from bovine, rabbit, and rat brain. *Arch Biochem Biophys*. 422, 191-6.

- Chodzko-Zajko, W.J., Moore, K.A., 1994. Physical fitness and cognitive functioning in aging. *Exerc Sport Sci Rev.* 22, 195-220.
- Choi, D.W., Koh, J.Y., Peters, S., 1988. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci.* 8, 185-96.
- Clapham, D.E., 1995. Calcium signaling. *Cell.* 80, 259-68.
- Cohen, M.M., Pettegrew, J.W., Kopp, S.J., Minshew, N., Glonek, T., 1984. P-31 nuclear magnetic resonance analysis of brain: normoxic and anoxic brain slices. *Neurochem Res.* 9, 785-801.
- Collingridge, G.L., Singer, W., 1990. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci.* 11, 290-6.
- Collins, T.J., Lipp, P., Berridge, M.J., Bootman, M.D., 2001. Mitochondrial Ca(2+) uptake depends on the spatial and temporal profile of cytosolic Ca(2+) signals. *J Biol Chem.* 276, 26411-20.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295-301.
- Cousin, M.A., Nicholls, D.G., Pocock, J.M., 1993. Flunarizine inhibits both calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes and cultured neurones. *Brain Res.* 606, 227-36.
- Crompton, M., Virji, S., Ward, J.M., 1998. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem.* 258, 729-35.
- Curtis, D.R., Watkins, J.C., 1961. Analogues of glutamic and gamma-amino-n-butyric acids having potent actions on mammalian neurones. *Nature.* 191, 1010-1.
- Dafre, A.L., Arteni, N.S., Siqueira, I.R., Netto, C.A., 2003. Perturbations in the thiol homeostasis following neonatal cerebral hypoxia-ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 345, 65-8.
- Danbolt, N., 2001. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology.* 65, 1-105.
- Danion, J.M., Meulemans, T., Kauffmann-Muller, F., Vermaat, H., 2001. Intact implicit learning in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 158, 944-8.
- De Camilli, P., Benfenati, F., Valtorta, F., Greengard, P., 1990. The synapsins. *Annu Rev Cell Biol.* 6, 433-60.
- Dere, E., Huston, J.P., De Souza Silva, M.A., 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 31, 673-704.
- Ding, Q., Vaynman, S., Akhavan, M., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2006a. Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. *Neuroscience.* 140, 823-33.
- Ding, Y., Young, C., Luan, X., Li, J., Rafols, J., Clark, J., McAllister, J., Ding, Y., 2005. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropathologica.* 109, 237-246.

- Ding, Y., Ding, Y., Li, J., Bessert, D., Rafols, J., 2006b. Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model. *Neurological research*. 28, 184-189.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A., 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 22, 391-7.
- Dohm, M.R., Hayes, J.P., Garland, T., Jr., 2001. The quantitative genetics of maximal and basal rates of oxygen consumption in mice. *Genetics*. 159, 267-77.
- Dolphin, A.C., Errington, M.L., Bliss, T.V., 1982. Long-term potentiation of the perforant path in vivo is associated with increased glutamate release. *Nature*. 297, 496-8.
- Dubow, J.S., Kelly, J.P., 2003. Epilepsy in sports and recreation. *Sports Med*. 33, 499-516.
- Dunant, Y., Israel, M., 1985. The release of acetylcholine. *Sci Am*. 252, 58-66.
- Dunkley, P.R., Heath, J.W., Harrison, S.M., Jarvie, P.E., Glenfield, P.J., Rostas, J.A., 1988. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1 fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res*. 441, 59-71.
- Eacott, M.J., Norman, G., 2004. Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? *J Neurosci*. 24, 1948-53.
- Elferink, L., Trimble, W., Scheller, R., 1989. Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system. *Journal of Biological Chemistry*. 264, 11061.
- Endres, M., Gertz, K., Lindauer, U., Katchanov, J., Schultze, J., Schröck, H., Nickenig, G., Kuschinsky, W., Dirnagl, U., Laufs, U., 2003. Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Annals of neurology*. 54, 582-590.
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 31, 47-59.
- Feany, M.B., Lee, S., Edwards, R.H., Buckley, K.M., 1992. The synaptic vesicle protein SV2 is a novel type of transmembrane transporter. *Cell*. 70, 861-867.
- Fischer von Mollard, G., Mignery, G.A., Baumert, M., Perin, M.S., Hanson, T.J., Burger, P.M., Jahn, R., Südhof, T., 1990. rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87, 1988.
- Fonnum, F., 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry*. 42, 1-11.
- Fournier, N., Ducet, G., Crevat, A., 1987. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr*. 19, 297-303.
- Funahashi, T., Floyd, R.A., Carney, J.M., 1994. Age effect on brain pH during ischemia/reperfusion and pH influence on peroxidation. *Neurobiol Aging*. 15, 161-7.
- Geppert, M., Archer, B.T., Südhof, T., 1991. Synaptotagmin II. A novel differentially distributed form of synaptotagmin. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 13548.
- Ghosh, A., Greenberg, M.E., 1995. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*. 268, 239-47.

- Gómez-Pinilla, F., Dao, L., So, V., 1997. Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. *Brain Research*. 764, 1-8.
- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., David, M.M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. 177, 751-66.
- Grace, L., Heschem, S., Kellaway, L.A., Bugarith, K., Russell, V.A., 2009. Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress. *Metabolic brain disease*. 24, 643-657.
- Gray, E.G., Whittaker, V.P., 1962. The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat*. 96, 79-88.
- Green, D.R., Reed, J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 281, 1309-12.
- Guatimosim, C., Romano-Silva, M.A., Cruz, J.S., Beirao, P.S., Kalapothakis, E., Moraes-Santos, T., Cordeiro, M.N., Diniz, C.R., Gomez, M.V., Prado, M.A., 1997. A toxin from the spider *Phoneutria nigriventer* that blocks calcium channels coupled to exocytosis. *Br J Pharmacol*. 122, 591-7.
- Gunter, T.E., Pfeiffer, D.R., 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol*. 258, C755-86.
- Gunter, T.E., Yule, D.I., Gunter, K.K., Eliseev, R.A., Salter, J.D., 2004. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*. 567, 96-102.
- Halestrap, A.P., Connern, C.P., Griffiths, E.J., Kerr, P.M., 1997. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*. 174, 167-72.
- Halestrap, A.P., McStay, G.P., Clarke, S.J., 2002. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*. 84, 153-66.
- Halestrap, A.P., 2006. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans*. 34, 232-7.
- Hannesson, D.K., Vacca, G., Howland, J.G., Phillips, A.G., 2004. Medial prefrontal cortex is involved in spatial temporal order memory but not spatial recognition memory in tests relying on spontaneous exploration in rats. *Behav Brain Res*. 153, 273-85.
- He, L., Lemasters, J.J., 2002. Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett*. 512, 1-7.
- Hill, R.D., Storandt, M., Malley, M., 1993. The impact of long-term exercise training on psychological function in older adults. *J Gerontol*. 48, P12-7.
- Hirokawa, N., Sobue, K., Kanda, K., Harada, A., Yorifuji, H., 1989. The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1. *The Journal of cell biology*. 111-126.
- Hollmann, M., Heinemann, S., 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci*. 17, 31-108.
- Horel, J.A., 1978. The neuroanatomy of amnesia. A critique of the hippocampal memory hypothesis. *Brain*. 101, 403-45.
- Hunter, D.R., Haworth, R.A., 1979. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 195, 453-9.

- Inal, M., Akyuz, F., Turgut, A., Getsfrid, W.M., 2001. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc.* 33, 564-7.
- Izquierdo, I., Izquierdo, L., Barros, D., Mello e Souza, T., De Souza, M., Quevedo, J., Rodrigues, C., Kauer, S.A., 1998. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behavioural Pharmacology.*
- Izquierdo, I., Vianna, M.R.M., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Szapiro, G., Coitinho, A.S., Muller, L., Cammarota, M., Bevilaqua, L.R.M., Medina, J.H., 2002. Memory retrieval and its lasting consequences. *Neurotoxicity research.* 4, 573-593.
- Jia, J., Hu, Y., Wu, Y., Liu, G., Yu, H., Zheng, Q., Zhu, D., Xia, C., Cao, Z., 2009. Pre-ischemic treadmill training affects glutamate and gamma aminobutyric acid levels in the striatal dialysate of a rat model of cerebral ischemia. *Life sciences.* 84, 505-511.
- Johansson, B.B., Belichenko, P.V., 2002. Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22, 89-96.
- Jolitha, A.B., Subramanyam, M.V., Asha Devi, S., 2006. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Exp Gerontol.* 41, 753-63.
- Kass, I.S., Lipton, P., 1982. Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice. *J Physiol.* 332, 459-72.
- Katsura, K., Rodriguez de Turco, E.B., Folbergrova, J., Bazan, N.G., Siesjo, B.K., 1993. Coupling among energy failure, loss of ion homeostasis, and phospholipase A2 and C activation during ischemia. *J Neurochem.* 61, 1677-84.
- Katz, B., 1969. The release of neural transmitter substances, Vol., Thomas, Springfield, Ill.,.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H., 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 386, 493-5.
- Knaus, P., Marquèze-Pouey, B., Scherer, H., Betzt, H., 1990. Synaptoporin, a novel putative channel protein of synaptic vesicles. *Neuron.* 5, 453-462.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett.* 495, 12-5.
- Kroemer, G., Martin, S.J., 2005. Caspase-independent cell death. *Nat Med.* 11, 725-30.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 87, 99-163.
- Laake, J.H., Haug, F.M., Wieloch, T., Ottersen, O.P., 1999. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Res Brain Res Protoc.* 4, 173-84.
- Laurin, D., Verreault, R., Lindsay, J., MacPherson, K., Rockwood, K., 2001. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol.* 58, 498-504.

- Lee, M.H., Kim, H., Kim, S.S., Lee, T.H., Lim, B.V., Chang, H.K., Jang, M.H., Shin, M.C., Shin, M.S., Kim, C.J., 2003. Treadmill exercise suppresses ischemia-induced increment in apoptosis and cell proliferation in hippocampal dentate gyrus of gerbils. *Life Sci.* 73, 2455-65.
- Lewis, M.H., 2004. Environmental complexity and central nervous system development and function. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 10, 91-5.
- Li, J., Luan, X., Clark, J., Rafols, J., Ding, Y., 2004. Neuroprotection against transient cerebral ischemia by exercise pre-conditioning in rats. *Neurological research.* 26, 404-408.
- Lightfoot, J.T., Turner, M.J., Debate, K.A., Kleeberger, S.R., 2001. Interstrain variation in murine aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc.* 33, 2053-7.
- Lipton, P., 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 79, 1431-568.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 86, 147-57.
- Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H., Schubert, D., 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem.* 69, 581-93.
- Lutter, R., Saraste, M., van Walraven, H.S., Runswick, M.J., Finel, M., Deatherage, J.F., Walker, J.E., 1993. F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem J.* 295 (Pt 3), 799-806.
- Lynch, M., Voss, K., 1991. Presynaptic Changes in Long Term Potentiation: Elevated Synaptosomal Calcium Concentration and Basal Phosphoinositide Turnover in Dentate Gyrus. *Journal of Neurochemistry.* 56, 113-118.
- Malenka, R.C., 1999. Long-term potentiation--a decade of progress? *Science.* 285, 1870.
- Marian, M.J., Dean, W.L., 1999. Role of tyrosine phosphorylation in regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca²⁺ release in human platelets. *Platelets.* 10, 417-22.
- Martin, R.L., Lloyd, H.G., Cowan, A.I., 1994. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci.* 17, 251-7.
- McMahon, H.T., Nicholls, D.G., 1991. Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: evidence for biphasic release and triggering by localized Ca²⁺. *J Neurochem.* 56, 86-94.
- McMahon, H.T., Foran, P., Dolly, J.O., Verhage, M., Wiegant, V.M., Nicholls, D.G., 1992. Tetanus toxin and botulinum toxins type A and B inhibit glutamate, gamma-aminobutyric acid, aspartate, and met-enkephalin release from synaptosomes. Clues to the locus of action. *J Biol Chem.* 267, 21338-43.
- Meder, W., Fink, K., Gothert, M., 1997. Involvement of different calcium channels in K⁺- and veratridine-induced increases of cytosolic calcium concentration in rat cerebral cortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 356, 797-805.
- Meldrum, B., 1990. Pathophysiology of cerebral ischemia and trauma in relation to possible therapeutic approaches. *Prog Clin Biol Res.* 361, 275-90.

- Mello, P.B., Benetti, F., Cammarota, M., Izquierdo, I., 2008. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 80, 301-309.
- Mintz, I.M., Adams, M.E., Bean, B.P., 1992. P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron*. 9, 85-95.
- Monette, R., Small, D.L., Mealing, G., Morley, P., 1998. A fluorescence confocal assay to assess neuronal viability in brain slices. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2, 99-108.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65, 55-63.
- Nachshen, D.A., 1985. The early time course of potassium-stimulated calcium uptake in presynaptic nerve terminals isolated from rat brain. *J Physiol*. 361, 251-68.
- Nagley, P., Higgins, G.C., Atkin, J.D., Beart, P.M., 2010. Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurones. *Biochim Biophys Acta*. 1802, 167-85.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., Tsujimoto, Y., 2005. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 434, 652-8.
- Nedergaard, M., Takano, T., Hansen, A.J., 2002. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature Reviews Neuroscience*. 3, 748-755.
- Neeper, S., Gomez-Pinilla, F., Choi, J., Cotman, C., 1995. Exercise and brain neurotrophins. *Nature*. 373.
- Neeper, S., Gómez-Pinilla, F., Choi, J., Cotman, C., 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Research*. 726, 49-56.
- Newell, D.W., Hsu, S.S., Papermaster, V., Malouf, A.T., 1993. Colchicine is selectively neurotoxic to dentate granule cells in organotypic cultures of rat hippocampus. *Neurotoxicology*. 14, 375-80.
- Ngsee, J., Trimble, W., Elferink, L., Wendland, B., Miller, K., Calakos, N., Scheller, R., 1990. Molecular analysis of proteins associated with the synaptic vesicle membrane. Vol. 55, ed. ^eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 111.
- Nicholls, D., Sihra, T., Sanchez-Prieto, J., 1987a. Calcium-dependent and-independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *Journal of neurochemistry*. 49, 50-57.
- Nicholls, D.G., Sihra, T.S., Sanchez-Prieto, J., 1987b. Calcium-dependent and - independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem*. 49, 50-7.
- Nicholls, D.G., 1993. The glutamatergic nerve terminal. *Eur J Biochem*. 212, 613-31.
- Nicholls, D.G., Budd, S.L., 2000. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev*. 80, 315-60.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2002. *Bioenergetics 3*, Vol., Academic Press, San Diego, Calif.

- Nicoll, R.A., 2003. Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.* 358, 721.
- Nicotera, P., Orrenius, S., 1998. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium.* 23, 173-80.
- Nicotera, P., Lipton, S.A., 1999. Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19, 583-91.
- Nishizawa, Y., 2001. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci.* 69, 369-81.
- Nowycky, M.C., Thomas, A.P., 2002. Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci.* 115, 3715-6.
- O'Callaghan, R.M., Ohle, R., Kelly, A.M., 2007. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res.* 176, 362-6.
- Olney, J.W., 1969. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol.* 28, 455-74.
- Osorio, R.A., Silveira, V.L., Maldjian, S., Morales, A., Christofani, J.S., Russo, A.K., Silva, A.C., Picarro, I.C., 2003. Swimming of pregnant rats at different water temperatures. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 135, 605-11.
- Otera, H., Ohsakaya, S., Nagaura, Z., Ishihara, N., Mihara, K., 2005. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J.* 24, 1375-86.
- Pang, T.Y., Stam, N.C., Nithianantharajah, J., Howard, M.L., Hannan, A.J., 2006. Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. *Neuroscience.* 141, 569-84.
- Parsons, S.M., Koenigsberger, R., 1980. Specific stimulated uptake of acetylcholine by Torpedo electric organ synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 77, 6234.
- Pedersen, B.K., Hoffman-Goetz, L., 2000. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 80, 1055-81.
- Penzo, D., Petronilli, V., Angelin, A., Cusan, C., Colonna, R., Scorrano, L., Pagano, F., Prato, M., Di Lisa, F., Bernardi, P., 2004. Arachidonic acid released by phospholipase A(2) activation triggers Ca(2+)-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem.* 279, 25219-25.
- Perin, M.S., Fried, V.A., Mignery, G.A., Jahn, R., Südhof, T.C., 1990. Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C.
- Ploughman, M., Granter-Button, S., Chernenko, G., Tucker, B.A., Mearow, K.M., Corbett, D., 2005. Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. *Neuroscience.* 136, 991-1001.
- Pulsinelli, W., 1992. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet.* 339, 533-6.
- Pulsinelli, W.A., Brierley, J.B., 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 10, 267-72.

- Pulsinelli, W.A., 1985. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res.* 63, 29-37.
- Pysh, J.J., Weiss, G.M., 1979. Exercise during development induces an increase in Purkinje cell dendritic tree size. *Science.* 206, 230-2.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucsok, J., Sasvari, M., Nyakas, C., Goto, S., 2001. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem Int.* 38, 17-23.
- Radak, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., Jakus, J., Goto, S., 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int.* 49, 387-92.
- Reuter, H., 1996. Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr Opin Neurobiol.* 6, 331-7.
- Rogers, R.L., Meyer, J.S., Mortel, K.F., 1990. After reaching retirement age physical activity sustains cerebral perfusion and cognition. *J Am Geriatr Soc.* 38, 123-8.
- Romano-Silva, M.A., Ribeiro-Santos, R., Ribeiro, A.M., Gomez, M.V., Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Brammer, M.J., 1993. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca²⁺ entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J.* 296 (Pt 2), 313-9.
- Rosenthal, R.E., Hamud, F., Fiskum, G., Varghese, P.J., Sharpe, S., 1987. Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine. *J Cereb Blood Flow Metab.* 7, 752-8.
- Rothman, S.M., 1983. Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science.* 220, 536-7.
- Saelens, X., Festjens, N., Parthoens, E., Vanoverberghe, I., Kalai, M., van Kuppeveld, F., Vandenabeele, P., 2005. Protein synthesis persists during necrotic cell death. *J Cell Biol.* 168, 545-51.
- Sanchez-Prieto, J., Budd, D.C., Herrero, I., Vázquez, E., Nicholls, D.G., 1996. Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. *Trends in neurosciences.* 19, 235-239.
- Sandoval, M.E., 1980. Studies on the relationship between Ca²⁺ efflux from mitochondria and the release of amino acid neurotransmitters. *Brain Res.* 181, 357-67.
- Satoh, E., Shimeki, S., 2010. Acute restraint stress enhances calcium mobilization and glutamate exocytosis in cerebrocortical synaptosomes from mice. *Neurochem Res.* 35, 693-701.
- Satrustegui, J., Villalba, M., Pereira, R., Bogonez, E., Martinez-Serrano, A., 1996. Cytosolic and mitochondrial calcium in synaptosomes during aging. *Life Sci.* 59, 429-34.
- Sattler, R., Tymianski, M., 2000. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med.* 78, 3-13.
- Scheller, R., 1995. Membrane trafficking in the presynaptic nerve terminal. *Neuron.* 14, 893-897.
- Schinzel, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N.N., Moskowitz, M.A., Korsmeyer, S.J., 2005. Cyclophilin D is a


- component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 12005-10.
- Schmidt-Kastner, R., Freund, T.F., 1991. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience.* 40, 599-636.
- Scopel, D., Fochesatto, C., Cimarosti, H., Rabbo, M., Bello-Klein, A., Salbego, C., Netto, C.A., Siqueira, I.R., 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull.* 71, 155-9.
- Smith, M.L., Auer, R.N., Siesjo, B.K., 1984. The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* 64, 319-32.
- Steckler, T., Drinkenburg, W., Sahgal, A., Aggleton, J., 1998. Recognition memory in rats--I. Concepts and classification. *Progress in neurobiology.* 54, 289-311.
- Stummer, W., Baethmann, A., Murr, R., Schurer, L., Kempfski, O., 1995. Cerebral protection against ischemia by locomotor activity in gerbils: underlying mechanisms. *Stroke.* 26, 1423.
- Südhof, T., Lottspeich, F., Greengard, P., Mehl, E., Jahn, R., 1987. The cDNA and derived amino acid sequences for rat and human synaptophysin. *Nucleic acids research.* 15, 9607.
- Südhof, T.C., Czernik, A.J., Kao, H.T., Takei, K., Johnston, P.A., Horiuchi, A., Kanazir, S.D., Wagner, M.A., Perin, M.S., De Camilli, P., 1989. Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science.* 245, 1474.
- Südhof, T.C., Jahn, R., 1991. Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron.* 6, 665-77.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G., 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 397, 441-6.
- Sutoo, D., Akiyama, K., 2003. Regulation of brain function by exercise. *Neurobiol Dis.* 13, 1-14.
- Takahashi, T., Momiyama, A., 1993. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature.* 366, 156-8.
- Takamori, S., Rhee, J.S., Rosenmund, C., Jahn, R., 2000. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature.* 407, 189-194.
- Tavares, A., Cimarosti, H., Valentim, L., Salbego, C., 2001. Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroreport.* 12, 2705-9.
- Taylor, C.P., Burke, S.P., Weber, M.L., 1995. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. *J Neurosci Methods.* 59, 121-8.

- Titterness, A.K., Wiebe, E., Kwasnica, A., Keyes, G., Christie, B.R., 2011. Voluntary exercise does not enhance long-term potentiation in the adolescent female dentate gyrus. *Neuroscience*.
- Toldy, A., Atalay, M., Stadler, K., Sasvari, M., Jakus, J., Jung, K.J., Chung, H.Y., Nyakas, C., Radak, Z., 2009. The beneficial effects of nettle supplementation and exercise on brain lesion and memory in rat. *J Nutr Biochem*. 20, 974-81.
- 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, 1046-56.
- Trimble, W.S., Cowan, D.M., Scheller, R.H., 1988. VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 85, 4538.
- Valle, V.G., Fagian, M.M., Parentoni, L.S., Meinicke, A.R., Vercesi, A.E., 1993. The participation of reactive oxygen species and protein thiols in the mechanism of mitochondrial inner membrane permeabilization by calcium plus prooxidants. *Arch Biochem Biophys*. 307, 1-7.
- van Boxtel, M.P., Paas, F.G., Houx, P.J., Adam, J.J., Teeken, J.C., Jolles, J., 1997. Aerobic capacity and cognitive performance in a cross-sectional aging study. *Med Sci Sports Exerc*. 29, 1357-65.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 2, 266-70.
- Wang, X., Zhu, C., Qiu, L., Hagberg, H., Sandberg, M., Blomgren, K., 2003. Activation of ERK1/2 after neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J Neurochem*. 86, 351-62.
- Wang, X., Carlsson, Y., Basso, E., Zhu, C., Rousset, C.I., Rasola, A., Johansson, B.R., Blomgren, K., Mallard, C., Bernardi, P., Forte, M.A., Hagberg, H., 2009. Developmental shift of cyclophilin D contribution to hypoxic-ischemic brain injury. *J Neurosci*. 29, 2588-96.
- Wendland, B., Miller, K.G., Schilling, J., Scheller, R.H., 1991. Differential expression of the p65 gene family. *Neuron*. 6, 993-1007.
- White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S., 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*. 179, 1-33.
- Will, B., Galani, R., Kelche, C., Rosenzweig, M.R., 2004. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Prog Neurobiol*. 72, 167-82.
- Winstein, C.J., Merians, A.S., Sullivan, K.J., 1999. Motor learning after unilateral brain damage. *Neuropsychologia*. 37, 975-87.
- Wise, P.M., Dubal, D.B., Rau, S.W., Brown, C.M., Suzuki, S., 2005. Are estrogens protective or risk factors in brain injury and neurodegeneration? Reevaluation after the Women's health initiative. *Endocr Rev*. 26, 308-12.
- Woodfield, K., Ruck, A., Brdiczka, D., Halestrap, A.P., 1998. Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J*. 336 (Pt 2), 287-90.

- Yamagata, S.K., Parsons, S.M., 1989. Cholinergic Synaptic Vesicles Contain a V Type and a P Type ATPase. *Journal of Neurochemistry*. 53, 1354-1362.**
- Zanotti, A., Azzone, G.F., 1980. Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 201, 255-65.**
- Zhang, F., Wu, Y., Jia, J., Hu, Y., 2010. Pre-Ischemic Treadmill Training Induces Tolerance to Brain Ischemia: Involvement of Glutamate and ERK1/2. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 15, 5246.**
- 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.**
- Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A., Orrenius, S., 1999. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ*. 6, 644-51.**
- Zoratti, M., Szabo, I., 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 1241, 139-76.**
- Zucker, R.S., 1993. Calcium and transmitter release. *J Physiol Paris*. 87, 25-36.**

8. APÊNDICE

8.1. Aprovação do comitê de ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 154/2010**, relativo ao projeto intitulado "*Homeostase do CA2+ e função mitocondrial em hipocampo de ratos treinados submetidos à isquemia in vitro*", que tem como responsável(is) **André Ricardo Massensini**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **25/ 08/2010**.

Este certificado expira-se em **25/ 08/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 154/2010**, related to the project entitled "*CA2+ homeostasis and mitochondrial function in trained rats submitted to in vitro ischemia*", under the supervisors of **André Ricardo Massensini**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 25, 2010**.

This certificate expires in **August 25, 2015**.

Belo Horizonte, 27 de Agosto de 2010.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

8.2. Artigo submetido

Revista Brain Research Bulletin

DIFFERENTIAL EFFECTS OF SWIMMING TRAINING ON NEURONAL CALCIUM SENSOR-1 EXPRESSION IN RAT HIPPOCAMPUS/CORTEX AND IN OBJECT RECOGNITION MEMORY TASKS

Luciana Estefani Drumond ^a; Flávio Afonso Gonçalves Mourão ^a; Hércules Ribeiro Leite ^a; Renata Viana Abreu ^a; Helton José Reis ^b; Márcio Flávio Dutra Moraes ^a, Grace Schenatto Pereira ^a ; *André Ricardo Massensini ^a

^a Núcleo de Neurociências (NNC), Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

^b Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Number of text pages: 19

Number of figures: 3

Number of tables: 0

***Corresponding author:**

André Ricardo Massensini, Ph.D.
Núcleo de Neurociências
Department of Physiology and Biophysics
Institute of Biological Sciences - Federal University of Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - CEP 31270-901- Campus Pampulha
Belo Horizonte - MG - Brazil
Fax : +55 31 34092924 Phone: +55 31 34092957
Email: massen@icb.ufmg.br

ABSTRACT

Physical activity has been proposed as a behavioral intervention that improves learning and memory; nevertheless, the mechanisms underlying these health benefits are still not well understood. Neuronal Calcium Sensor-1 (NCS-1) is a member of a superfamily of proteins that respond to local Ca^{+2} changes shown to have an important role in learning and memory. The aim of the present study was to investigate the effects of swimming training on NCS-1 levels in the rat brain after accessing cognitive performance. Wistar rats were randomly assigned to sedentary (SG) or exercised groups (EG). The EG was subject to forced swimming activity, 30 min/day, 5 days/week, during 8 weeks. Progressive load trials were performed in the first and last week in order to access the efficiency of the training. After the 8 week training protocol, memory performance was evaluated by the novel object preference and object location tasks. NCS-1 levels were measured in the cortex and hippocampus using immunoblotting. The EG performed statistically better for the spatial short-term memory (0.73 ± 0.01) when compared to the SG (0.63 ± 0.02 ; $P < 0.05$). No statistically significant exercise-effect was observed in the novel object preference task (SG 0.65 ± 0.02 and EG 0.68 ± 0.02 ; $p > 0.05$). In addition, chronic exercise promoted a significant increase in hippocampal NCS-1 levels (1.8 ± 0.1) when compared to SG (1.17 ± 0.08 ; $P < 0.05$), but had no effect on cortical NCS-1 levels (SG 1.6 ± 0.1 and EG 1.5 ± 0.1 ; $p > 0.05$). Our results support the possibility that the swimming paradigm could enhance spatial memory performance through the regulation of the hippocampal NCS-1 expression.

KEYWORDS: calcium signaling, NCS-1, physical exercise, learning, memory.

1. Introduction

Regular physical activity is an essential component of a healthy lifestyle, with positive effects in human cognitive performance (Chodzko-Zajko and Moore, 1994; Etgen et al., 2010; Geda et al., 2010). Physical activity has been shown not only to activate (Czurko et al., 1999) but also to cause plastic changes within the central nervous system in many of the same areas involved in memory processing (Berchtold et al., 2005; Cotman and Berchtold, 2002). In fact, in animals performing voluntary wheel running, the hippocampal expression of BDNF is increased, along with others genes involved with synaptic plasticity, such as synapsin I, synaptotagmin and syntaxin (Molteni et al., 2002; Tong et al., 2001b). Furthermore, animal studies have demonstrated that exercise protects neurons from a variety of brain insults (Carro et al., 2001b; Tillerson et al., 2003) and promotes neurogenesis (van Praag et al., 1999).

Nevertheless, physical exercise may have contradictory effects on modulating cognitive function depending on the type and duration of the physical activity as well as the type of memory evaluated. Forced treadmill running can improve (Griffin et al., 2009; Hopkins and Bucci, 2010; O'Callaghan et al., 2007) but also impair (Mello et al., 2008) object recognition memory (ORM), though having no effect on the Morris water maze memory evaluation (Mello et al., 2008; O'Callaghan et al., 2007). Interestingly, voluntary exercise enhances object recognition performance in animals categorized as low-runners, but compromises performance in high and very-high runners (García-Capdevila et al., 2009). The apparent paradox regarding the dual-effect of exercise in ORM can be explained by exploring in further detail the type of memory being evaluated and the brain areas primarily involved.

Object recognition memory is a declarative-like memory that may be commonly divided into two distinct components: the novelty and the spatial location of the objects (Barker et al., 2007; Dere et al., 2005). The before mentioned components have been shown to differentially recruit brain regions involved in ORM, such as the hippocampus and other cortical structures, specially the perihinal cortex (Dere et al., 2007; Winters et al., 2004). For

example, using a spontaneous object recognition test designed to minimize spatial and contextual factors, Forwood and coworkers (2005) showed that rats with complete excitotoxic lesions of the hippocampus had compromised performance in spatial memory tasks while the performance in the novelty object task was unaltered (Forwood et al., 2005). There is an overwhelming amount of data describing the possible biochemical cascades involved in ORM; however, not much is known of how physical exercise modulates them.

The NCS-1 (neuronal calcium sensor 1) is a promising candidate to intermediate the effects of exercise in cognitive processes. NCS-1 is a mammalian orthologue of frequenin, member of an important family of proteins able to detect and transmit calcium signals across several cellular responses (Hendricks et al., 1999); which widely distributed in the nervous system, particularly expressed in the hippocampus (Genin et al., 2001; Martone et al., 1999; Olafsson et al., 1997). Among its action in several aspects of brain function, NCS-1 enhances the number of functional synapses (Chen et al., 2001), acts in short-term plasticity in rat hippocampal cell cultures (Sippy et al., 2003) and is expressed in several neural networks commonly known to play an essential role in associative learning and memory (Gomez et al., 2001). The overexpression of this protein has been shown to enhance evoked neurotransmitter release and exocytosis (Olafsson et al., 1995; Pongs et al., 1993) as well as to promote synaptic plasticity, exploratory behavior, and rapid acquisition of spatial memory (Saab et al., 2009).

The present study was designed to assess whether physical exercise in rats enhances NCS-1 expression. Considering that NCS-1 expression is particularly high in the hippocampus, exercise paradigms that modulate NCS-1 will have greater impact on memory tasks that are primarily related to this neural substrate (i.e. the spatial memory task). Animals were subject to a chronic swimming exercise paradigm and tested for both novelty object and spatial memory tasks. NCS-1 expression in the cortex and hippocampus was quantified by immunoblot optical densitometry.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats weighing between 150–200g were supplied by the CEBIO-ICB-UFMG vivarium. The animals were allowed free access to food and water and were housed four animals/cage, in a temperature controlled environment, under a 12 hour light-dark cycle. Efforts were made to avoid any unnecessary distress to the animals and the lowest possible number of animals was used. All experimental procedures were conducted in accordance with NIH guidelines for the care and use of animals and with approved animal protocols from the Institutional Animal Care and Use Committees at the Federal University of Minas Gerais (Protocol n^o. 21/2009).

2.2. Swimming Exercise Protocol

The swimming apparatus consisted of four independent glass pools with dimensions 20x20x70cm, with a closed loop of circulating water maintained at 32.0 ± 1.0 degrees Celsius. Animals were placed and removed from the apparatus using a “fish” net. In the first week, all animals were submitted to an adaptation protocol consisting of four daily swimming episodes of different durations (10, 15, 20 and 25 minutes). In the fifth day all animals were subject to a progressive load test in order to determine the maximal supported load (MSL) per rat ($\text{load(g)}/\text{b.w.(g)} \times 100$). The MSL was determined by placing each animal in the water while a step increase of weight, corresponding to 1% of the rats’ body weight, was attached to the tail every 3 minutes until exhaustion (determined by 10 continuous seconds submerged). At this point, animals were randomly divided in two groups: exercise group (EG, n=25) and sedentary group (SG, n=25). The EG was subject, in the following 8 weeks, for 5 days/week, to 30 minutes of continuous swimming training exercise with 60% of the MSL workload obtained in the progressive load test; adapted from Machado et al. (Machado et al., 2006).

The maximal weight carried by the animal in the progressive load test was converted to percentage of the animal body weight. Thus, every week animals were weighed and, using the previously calculated percentage value, a new

maximal load was obtained and the 60% workload was determined (Almeida et al., 2009). At the end of training protocol a new progressive load test was performed to compare the physical capacity of both groups.

The SG animals were exposed to shallow water, instead of the swimming protocol of the EG, for 30 minutes/5 days/week during the 8 weeks of the experiment. An acrylic platform placed 5cm under water surface allowed SG animals to stand normally with their head above the water without need to swim.

2.3. Behavioral test

Exploration occurred in an open-topped arena (50x50x40 cm) made of acrylic. The walls inside the arena were surrounded with a black paper so that no external stimuli could be seen during the experiment. The stimuli presented were copies of objects composed of plastic pieces (Gulliver, São Caetano do Sul, SP, Brasil) that varied in shape, color, and size. Objects were fixed in the base of the arena to avoid displacement during tasks. To control the odor cues, the open field arena and the objects were thoroughly cleaned with water, dried and ventilated for a few minutes between experiments. Twenty-four hours before sample protocol all animals were habituated to the experimental arena in the absence of any specific behavioral stimulus for 20 min.

The procedures comprised an acquisition or sample phase, followed by a preference test after a delay of 60 min to test short-term memory (STM).

2.3.1. Novel object preference task - In this object recognition task rats were placed in an open box and allowed to explore two identical objects (sample phase) for 5 minutes and then returned to their home cage. After a delay of 60 minutes, the rats were returned to the open box where they were exposed to two different objects (test phase), one identical to the one previously encountered in the sample phase, therefore now familiar, and the other is novel. The rats were allowed to explore both objects for more 5 minutes (Abreu et al., 2011).

2.3.2. Object location task – In another version of the task, recognition memory of object location is measured. In this task, rats are exposed in the choice phase to two identical objects. These objects are identical to those previously shown in the sample phase except that one of these objects is moved

to a new location in the arena of the box. Time exploring each object was assessed for 5min (Ennaceur and Delacour, 1988).

The positions of the objects in the test and the objects used as novel or familiar were counterbalanced between the animals. Exploratory behavior was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Any other behavior, such as sitting on or turning around the object was not considered as exploration. A blind observer to the treatment recorded the time spent to explore each object and the discrimination index was calculated as the time spent by each animal exploring the novel object or the displaced object divided by the total time spent exploring both objects.

2.4. Immunoblotting After behavioral test the rats were killed by decapitation and their brain rapidly (<1 min) removed and submerged in cold (4°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mMol/L): 127 NaCl, 2 KCl, 10 glucose, 1.2 KH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 2 MgSO₄, 2 CaCl₂, 10 HEPES bubbled with 95% O₂/5% CO₂. Both hippocampi and cortices were dissected and separately sonicated in lysis buffer containing (in mMol/L): 125 NaCl, 20 TRIS-HCl, 10 EGTA, 5 EDTA, protease inhibitor cocktail (40µL/mL, Sigma-Aldrich, USA) and centrifugation at 13,000 g for 20 min at 4°C. Supernatants were transferred to plastic tubes and stored (-80 C). Protein was quantified by Bradford's method (Bradford, 1976).

Equal amounts of protein (35µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE 12%) and transferred to PVDF membranes. The membranes were sequentially immunoblotted using antibodies raised against NCS-1 (FL-190, 1:2,000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, USA) and actin (1:2,000 dilution, Chemical International, USA) for 2h at room temperature. Antibody binding was revealed by incubation with a goat anti-rabbit horseradish peroxidase-linked IgG (1:20,000 dilution, Molecular Probes, USA) or a goat antimouse horseradish peroxidase-linked IgG (1:7,000 dilution, Molecular Probes, USA) for 1 h at room temperature, in the presence of Immobilon immunoblotting detection system (Millipore corporation, USA). Chemiluminescence was detected by autoradiography using Kodak film and

apparent bands of NCS-1 and actin were quantified by densitometry using the software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). For each experiment, values obtained for NCS-1 were corrected having actin values as reference.

2.5. Statistics Data are presented as means \pm S.E.M. Statistical comparisons were made using Student's t-test for progressive load test, total time investigating the objects and NCS-1 Immunoblotting. In behavioral test, first we performed one-sample t-test, against a 0.5 value expected population mean, to evaluate if animals explore the new object or displaced object over the familiar one during the test session. The comparison between groups SG v.s. EG, was performed by means of *two-way ANOVA pos-hoc Tukey* for discrimination index. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3- Results

3.1. Exercise training

Before the 8-week training procedure, animals were evaluated according to the maximum supported load (MSL - 17.0 ± 0.4 g). After being randomly assigned to either SG or EG animals, the MSL values were not statistically different between groups (16.6 ± 0.6 g and 17.5 ± 0.7 g, respectively). However, at the end of the training protocol, the ability to support load by the EG ($7.3 \pm 0.4\%$ body mass) was significantly higher than the SG ($5.6 \pm 0.2\%$ body mass, $t(48) = 3.5$, $P < 0.001$), figure 1.

3.2. Object location memory

There was no overall exercise-effect on total time of exploration during the sample phase of the object location task (SG = 12 ± 7 s; EG = 17 ± 10 s; $P > 0.05$). Also, the one-sample *t* test confirmed that the performance in the test phase of both groups [EG, $t(14) = 13.57$, $p < 0.0001$, and SG, $t(14) = 5.85$, $P < 0.0001$] was statistically different from chance level. However, as showed in the Figure 2A, there was a statistical difference between SG (0.63 ± 0.02) and EG (0.73 ± 0.01) ($t(28) = 3.47$, $P = 0.001$) in the test phase. Taken together our results demonstrated that the swimming training protocol did not affect the exploratory activity of the rats but did improve performance in the object location memory.

3.3. Novel object preference memory

The swimming exercise also did not alter the exploratory activity of the rats in the sample phase of the novel object preference task (SG = 9 ± 1 s; EG = 7 ± 0.6 s; $P > 0.05$). One-sample *t* test confirmed that the performance in the test phase, of both groups [EG, $t(9) = 7.00$, $P < 0.0001$, and SG, $t(9) = 7.10$, $P < 0.0001$], was statistically different from chance level. In contrast to the object location task, Student's *t* test showed no significant difference between the SG (0.65 ± 0.02) and EG (0.68 ± 0.02) ($t(18) = 1.78$, $P = 0.09$) (Figure 2B). In summary, our results do not show an effect of chronic swimming exercise in the novel object preference memory.

3.4. NCS-1 expression

The figure 3 illustrates the effects of exercise on NCS-1 protein levels in the cortex and hippocampus. Exercise (1.8 ± 0.1) increased NCS-1 expression in the hippocampus of rats when compared to the SG (1.2 ± 0.08) ($t(8) = 3.8$, $P = 0.005$). In contrast, EG did not change NCS-1 expression in the cortex (SG = 1.6 ± 0.1 and EG = 1.5 ± 0.1) ($t(8) = 0.73$, $P = 0.48$). Our results show that swimming training increases NCS-1 expression specifically in the hippocampus.

4- Discussion

As proof of its efficiency, the 8 week training protocol (using 60% of MSL during swimming) significantly increased the ability of the EG animals to support higher loads when compared to the SG. Such known adaptations to exercise are a result of a coordinated response of multiple organ systems, including pulmonary, cardiovascular, endocrine-metabolic and skeletal muscle (Mordess et al., 2004; Sclafani, 1984). In order to avoid undesirable effects of intense physical exercise, such as muscle lesions and incomplete substrate levels restoration between one exercise-session and the next, our training sessions used a load that corresponded to less than 6% of the animal's body weight, reference value based on other studies found throughout literature (Gobatto et al., 2001; Manchado et al., 2006). The MSL/b.w. values shown in figure 1 are similar to these found in other report, Gobatto et al (2001) shows that after physical training, the animals elevated the maximal load to 8% of body mass (Gobatto et al., 2001).

In the behavioral test, during the sample phase, sedentary and exercise groups spent equivalent time investigating the objects and no differences between groups were observed in ambulation, anxiety, grooming or risk-assessing behaviors (data not shown). Altogether, this data suggest that swimming exercise does not result in an enhanced stress response. In fact, previous research showed that although acute forced exercise elevates corticosterone (Ploughman et al., 2005; Ploughman et al., 2007), hypothalamic-pituitary-adrenal axis seems to adapt to chronic exercise. In effect after several weeks of training, the exercise no longer elevates corticosterone levels (Fediuc et al., 2006).

Regarding the memory results, both groups were able to discriminate between displaced and stationary object, however the exercise group showed stronger preference for the displaced object, indicating enhancement of short-term object recognition memory. In the novel object task, although the groups were able to discriminate between novel and familiar objects, there was no statistical difference in the discrimination of objects between the sedentary and the exercise group during the test phase. This difference could be explained by the distinct recruitment of the cortex and hippocampus in these two kinds of memory (Winters and Dunnett, 2004). In fact, perirhinal cortex lesion affects object recognition but not spatial memories (Aggleton et al., 2004), whereas hippocampal lesions result in little, if any, disruption of object recognition memory (Mumby, 2001), but impairs spatial memory (Winters and Dunnett, 2004). Moreover, gene expression studies provide exactly the same pattern of differential involvement of these neural substrates. The presentation of novel, individual visual stimuli evokes increased Fos levels in the perirhinal cortex but not in the hippocampus. In contrast, performing spatial tasks or being exposed to novel spatial arrays of visual stimuli does not increase perirhinal Fos levels but does alter Fos levels throughout much of the hippocampal formation (Aggleton and Brown, 2005). The interpretation of the behavioral data presented here is furthermore strengthened by the immunoblot results showing that the exercise

paradigm significantly increased NCS-1 expression in the hippocampus (related to spatial memory) but not in cortical areas.

Our results indicate that probably the chronic swimming training used in this experiment significantly affected the region of the hippocampus, improving the spatial memory, as suggested by an increase in the hippocampal NCS-1 expression for the EG. On the other hand, the exercise protocol had no effect on object recognition memory and similarly on cortical NCS-1 expression. Our results are in accordance with other authors that have reported favorable effects of physical exercise on memory (Alaei et al., 2008; Ang et al., 2006; Blustein et al., 2006; Ogonovszky et al., 2005; Radak et al., 2006; Uysal et al., 2005; van Praag et al., 2005).

Interestingly, Saab et al. (2009), demonstrated that mice with inducible overexpression of NCS-1 in dentate gyrus had better ability to discriminate between displaced and stationary objects when compared to wild type group, but no difference was observed for the familiar and novel objects in short and long-term object recognition memory tasks. These data suggest a participation of NCS-1 in mechanisms involving synaptic plasticity and acquisition of spatial memory (Saab et al., 2009).

The cause-effect relation of hippocampal NCS-1 expression and its functional role in memory is not straightforward. Nevertheless, there are some hypotheses concerning its role in the modulation of several target proteins. NCS-1 can substitute or potentiate calmodulin (CaM) functions (Schaad et al., 1996). Thus, its regulated transcription is likely to cause a functional change in synapse sensitivity to Ca²⁺ and Ca²⁺-signaling pathways (Burgoyne and Weiss, 2001; McFerran et al., 1999), via the activation of proteins as cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE), calcineurin and nitric oxide synthase (Schaad et al., 1996). Another hypothesis is that NCS-1 binds dopamine type-2 receptor, (D2R), regulates D2R phosphorylation through an interaction with G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2), and controls DR2 surface expression (Kabbani et al., 2002). Saab et al. (2009) showed that direct application of a cell permeant peptide (DNIP) designed to interfere with NCS-1 binding to the DR2 reversed the

improvement in the acquisition of spatial memory in mice that overexpress NCS-1 (Saab et al., 2009).

In conclusion, the present study reinforces the promnesic exercise-effect and shows for the first time that swimming exercise up regulates NCS-1 expression in the hippocampus. A negative result regarding NCS-1 expression in the hippocampus would have compromised the rational of a possible cause-effect relation with the improved performance in spatial-memory. Nevertheless, although the precise role of NCS-1 in the hippocampus of training animals remains not understood, our results contribute to a possible role of Ca²⁺ signaling through NCS-1 in the pathway involved in the enhancement of spatial memory acquisition during regular swimming training.

ACNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Brazilian agencies CNPq, FAPEMIG, CAPES and PRPq /UFMG for financial support. ARM, GSP, MFDM are CNPq research fellows.

REFERENCES

- Abreu, R., Silva-Oliveira, E., Moraes, M., Pereira, G., Moraes-Santos, T., 2011. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*.
- Aggleton, J.P., Kyd, R.J., Bilkey, D.K., 2004. When is the perirhinal cortex necessary for the performance of spatial memory tasks? *Neurosci Biobehav Rev.* 28, 611-24.
- Aggleton, J.P., Brown, M.W., 2005. Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *Q J Exp Psychol B.* 58, 218-33.
- Alaei, H., Moloudi, R., Sarkaki, A.R., 2008. Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *J Bodyw Mov Ther.* 12, 72-5.
- Almeida, P.W., Gomes-Filho, A., Ferreira, A.J., Rodrigues, C.E., Dias-Peixoto, M.F., Russo, R.C., Teixeira, M.M., Cassali, G.D., Ferreira, E., Santos, I.C., Garcia, A.M., Silami-Garcia, E., Wisloff, U., Pussieldi, G.A., 2009. Swim training suppresses tumor growth in mice. *J Appl Physiol.* 107, 261-5.
- Ang, E.T., Dawe, G.S., Wong, P.T., Moochhala, S., Ng, Y.K., 2006. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res.* 1113, 186-93.
- Barker, G.R.I., Bird, F., Alexander, V., Warburton, E., 2007. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *The Journal of Neuroscience.* 27, 2948.
- Berchtold, N.C., Chinn, G., Chou, M., Kesslak, J.P., Cotman, C.W., 2005. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 133, 853-61.
- Blustein, J.E., McLaughlin, M., Hoffman, J.R., 2006. Exercise effects stress-induced analgesia and spatial learning in rats. *Physiol Behav.* 89, 582-6.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Burgoyne, R.D., Weiss, J.L., 2001. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem J.* 353, 1-12.

- Carro, E., Trejo, J.L., Busiguina, S., Torres-Aleman, I., 2001. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci.* 21, 5678-84.
- Chen, X.L., Zhong, Z.G., Yokoyama, S., Bark, C., Meister, B., Berggren, P.O., Roder, J., Higashida, H., Jeromin, A., 2001. Overexpression of rat neuronal calcium sensor-1 in rodent NG108-15 cells enhances synapse formation and transmission. *J Physiol.* 532, 649-59.
- Chodzko-Zajko, W.J., Moore, K.A., 1994. Physical fitness and cognitive functioning in aging. *Exerc Sport Sci Rev.* 22, 195-220.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295-301.
- Czurko, A., Hirase, H., Csicsvari, J., Buzsaki, G., 1999. Sustained activation of hippocampal pyramidal cells by 'space clamping' in a running wheel. *Eur J Neurosci.* 11, 344-52.
- Dere, E., Huston, J.P., De Souza Silva, M.A., 2005. Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain research protocols.* 16, 10-19. Dere, E., Huston, J.P., De Souza Silva, M.A., 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 31, 673-704.
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 31, 47-59.
- Etgen, T., Sander, D., Huntgeburth, U., Poppert, H., Forstl, H., Bickel, H., 2010. Physical activity and incident cognitive impairment in elderly persons: the INVADE study. *Arch Intern Med.* 170, 186-93.
- Fediuc, S., Campbell, J.E., Riddell, M.C., 2006. Effect of voluntary wheel running on circadian corticosterone release and on HPA axis responsiveness to restraint stress in Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol.* 100, 1867-75.
- Forwood, S.E., Winters, B.D., Bussey, T.J., 2005. Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus.* 15, 347-55.
- García-Capdevila, S., Portell-Cortés, I., Torras-Garcia, M., Coll-Andreu, M., Costa-Miserachs, D., 2009. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behavioural brain research.* 202, 162-170.

- Geda, Y.E., Roberts, R.O., Knopman, D.S., Christianson, T.J., Pankratz, V.S., Ivnik, R.J., Boeve, B.F., Tangalos, E.G., Petersen, R.C., Rocca, W.A., 2010. Physical exercise, aging, and mild cognitive impairment: a population-based study. *Arch Neurol.* 67, 80-6.
- Genin, A., Davis, S., Meziane, H., Doyere, V., Jeromin, A., Roder, J., Mallet, J., Laroche, S., 2001. Regulated expression of the neuronal calcium sensor-1 gene during long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Neuroscience.* 106, 571-7.
- Gobatto, C.A., de Mello, M.A., Sibuya, C.Y., de Azevedo, J.R., dos Santos, L.A., Kokubun, E., 2001. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 130, 21-7.
- Gomez, M., De Castro, E., Guarin, E., Sasakura, H., Kuhara, A., Mori, I., Bartfai, T., Bargmann, C.I., Nef, P., 2001. Ca²⁺ signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *C. elegans*. *Neuron.* 30, 241-8.
- Griffin, É.W., Bechara, R.G., Birch, A.M., Kelly, Á.M., 2009. Exercise enhances hippocampal dependent learning in the rat: Evidence for a BDNF related mechanism. *Hippocampus.* 19, 973-980.
- Hendricks, K.B., Wang, B.Q., Schnieders, E.A., Thorner, J., 1999. Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. *Nat Cell Biol.* 1, 234-41.
- Hopkins, M.E., Bucci, D.J., 2010. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. *Neurobiology of learning and memory.*
- Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., Goldman-Rakic, P., Levenson, R., 2002. Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci.* 22, 8476-86.
- Manchado, F.D.B., Gobatto, C.A., Voltarelli, F.A., Rostom de Mello, M.A., 2006. Non-exhaustive test for aerobic capacity determination in swimming rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 31, 731-6.
- Martone, M.E., Edelman, V.M., Ellisman, M.H., Nef, P., 1999. Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. *Cell Tissue Res.* 295, 395-407.

- McFerran, B.W., Weiss, J.L., Burgoyne, R.D., 1999. Neuronal Ca(2+) sensor 1. Characterization of the myristoylated protein, its cellular effects in permeabilized adrenal chromaffin cells, Ca(2+)-independent membrane association, and interaction with binding proteins, suggesting a role in rapid Ca(2+) signal transduction. *J Biol Chem.* 274, 30258-65.
- Mello, P.B., Benetti, F., Cammarota, M., Izquierdo, I., 2008. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 80, 301-309.
- Molteni, R., Ying, Z., Gómez Pinilla, F., 2002. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *European Journal of Neuroscience.* 16, 1107-1116.
- Mordes, J.P., Bortell, R., Blankenhorn, E.P., Rossini, A.A., Greiner, D.L., 2004. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *ILAR J.* 45, 278-91.
- Mumby, D.G., 2001. Perspectives on object-recognition memory following hippocampal damage: lessons from studies in rats. *Behav Brain Res.* 127, 159-81.
- O'Callaghan, R.M., Ohle, R., Kelly, A.M., 2007. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial-and non-spatial learning. *Behavioural brain research.* 176, 362-366.
- Ogonovszky, H., Berkes, I., Kumagai, S., Kaneko, T., Tahara, S., Goto, S., Radak, Z., 2005. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. *Neurochem Int.* 46, 635-40.
- Olafsson, P., Wang, T., Lu, B., 1995. Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca(2+)-binding protein frequenin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 8001-5.
- Olafsson, P., Soares, H.D., Herzog, K.H., Wang, T., Morgan, J.I., Lu, B., 1997. The Ca²⁺ binding protein, frequenin is a nervous system-specific protein in mouse preferentially localized in neurites. *Brain Res Mol Brain Res.* 44, 73-82.
- Ploughman, M., Granter-Button, S., Chernenko, G., Tucker, B.A., Mearow, K.M., Corbett, D., 2005. Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. *Neuroscience.* 136, 991-1001.
- 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.
- Pongs, O., Lindemeier, J., Zhu, X.R., Theil, T., Engelkamp, D., Krah-Jentgens, I., Lambrecht, H.G., Koch, K.W., Schwemer, J., Rivosecchi, R., et al., 1993. Frequentin--a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. *Neuron.* 11, 15-28.
- Radak, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., Jakus, J., Goto, S., 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int.* 49, 387-92.
- Saab, B.J., Georgiou, J., Nath, A., Lee, F.J., Wang, M., Michalon, A., Liu, F., Mansuy, I.M., Roder, J.C., 2009. NCS-1 in the dentate gyrus promotes exploration, synaptic plasticity, and rapid acquisition of spatial memory. *Neuron.* 63, 643-56.
- Schaad, N.C., De Castro, E., Nef, S., Hegi, S., Hinrichsen, R., Martone, M.E., Ellisman, M.H., Sikkink, R., Rusnak, F., Sygush, J., Nef, P., 1996. Direct modulation of calmodulin targets by the neuronal calcium sensor NCS-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 9253-8.
- Sclafani, A., 1984. Animal models of obesity: classification and characterization. *Int J Obes.* 8, 491-508.
- Sippy, T., Cruz-Martin, A., Jeromin, A., Schweizer, F.E., 2003. Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat Neurosci.* 6, 1031-8.
- Tillerson, J.L., Caudle, W.M., 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.
- Tong, L., Shen, H., Perreau, V.M., Balazs, R., Cotman, C.W., 2001. Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. *Neurobiology of disease.* 8, 1046-1056.
- Uysal, N., Tugyan, K., Kayatekin, B.M., Acikgoz, O., Bagriyanik, H.A., Gonenc, S., Ozdemir, D., Aksu, I., Topcu, A., Semin, I., 2005. The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neurosci Lett.* 383, 241-5.
- van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J., Gage, F.H., 1999. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 13427-31.

- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., Gage, F.H., 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci.* 25, 8680-5.
- Winters, B.D., Dunnett, S.B., 2004. Selective lesioning of the cholinergic septo-hippocampal pathway does not disrupt spatial short-term memory: a comparison with the effects of fimbria-fornix lesions. *Behav Neurosci.* 118, 546-62.
- Winters, B.D., Forwood, S.E., Cowell, R.A., Saksida, L.M., Bussey, T.J., 2004. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: Heterogeneity of function within the temporal lobe. *The Journal of Neuroscience.* 24, 5901.

Figure legends:

Figure 1 - Effects of chronic swimming training on progressive load test.

The maximal supported load (load(g)/b.w.(g)*100) was determined by placing each animal in the water while a step increase of weight, corresponding to 1% of the rats' body weight, was attached to the tail every 3 minutes until exhaustion (determined by 10 continuous seconds submerged). Data are shown as means \pm SEM (n=25) of the maximal % body mass supported (g), in the end of 8 week. *P<0.05 in Student's *t*-test.

Figure 2 – Effects of chronic swimming training on behavioral test. A- Object location task. **B-** Novel object preference task. Rats were exposed to two equal objects for 5 min in the sample session. One hour later a short-term memory (STM) test was carried out: animals were exposed to a stationary object and a displaced object again for 5 min in the object location task (n=15) and the animals were exposed to a familiar object and a novel object again for 5 min in the object preference task (n=10). Data are presented as means \pm SEM of the displaced object and novel object discrimination index respectively. ** P<0,01 vs. before sample, ## P<0,01 Exercise vs. Sedentary in *Two-way* ANOVA, *post-hoc* Tukey.

Figure 3 - Effects of chronic swimming training on NCS-1 expression in hippocampal and cortical rats. Representative immunoblotting scanned images and quantification by optic densitometry from **A** - hippocampus (n=4) and **B**- cortex (n=5). Data are presented as means \pm SEM . * P < 0.05 in Student's *t*-test; normalized against β -actin levels.

Figure 1

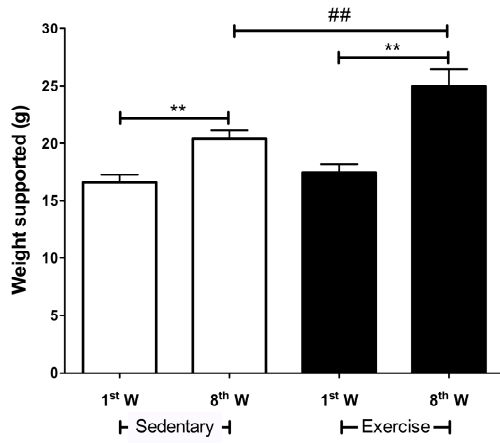


Figure 2

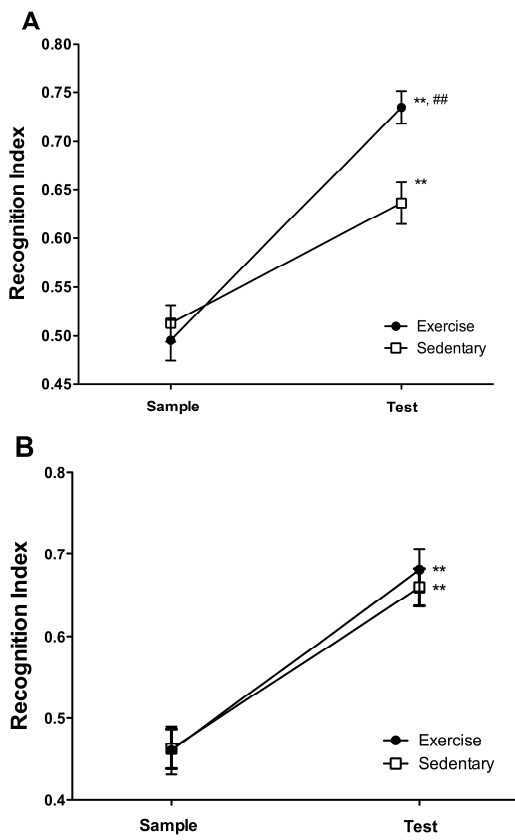
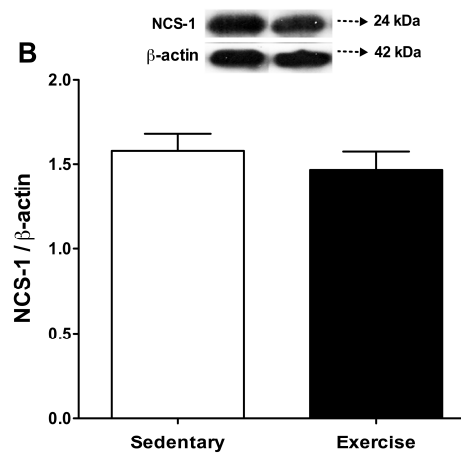
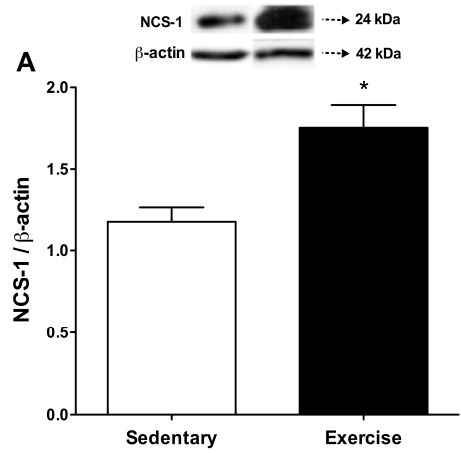


Figure 3



8.3. Lista de drogas, reagentes e anticorpos

DESCRIÇÃO	FABRICANTE / N°.Cat.
agaIV (toxina)	Peptide Institute Inc. (Japan).
ANT (anticorpo)	Santa Cruz/ 9299
Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugated	Sigma-Aldrich®/ A4416
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich® / B6916
Calcium green 5N	Invitrogen/ C3737
COX4 (anticorpo)	Santa Cruz/ 58348
CypD (anticorpo)	Calbiochem / E11AE12BD4
CsA	Sigma-Aldrich®/ C3662
Digitonina	Sigma-Aldrich®/ D141
EGTA	Sigma-Aldrich®/ E3889
EGTA-AM	Calbiochem/324628
EthD-1	Invitrogen/E1169
FCCP	Sigma-Aldrich® / C2920
Fura-2	Invitrogen/T7508
GDH	Sigma-Aldrich® / G2626
Glutamato	Sigma-Aldrich® / 49449
Malato	Sigma-Aldrich®
MTT	Sigma-Aldrich® /M2128
MVIIC (toxina)	Latoxan/ L8504
NAD	Sigma-Aldrich® / N0505
Oligomicina	Sigma-Aldrich®/O4876
Safranina	Sigma-Aldrich®/S8884
SDS	Sigma-Aldrich® / L3771
Veratridina	Sigma-Aldrich® /V5754
NaCl, KCl, CaCl ₂ , MgSO ₄ , NaHCO ₃ , CaCl ₂ , KH ₂ PO ₄ , Glicose, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ ,	Merck & Co., Inc

8.4. Lista de equipamentos:

NOME	MODELO / MARCA
Fatiador de tecidos	Vibratome/ série1000 / Technical Products International,USA
Fatiador de tecidos	Tissue Chopper / Mcllwain™ Brinkmann Instruments, England
Centrífuga	5415R / Eppendorf
Centrífuga	Sigma
Centrífuga	Hitachi
Espectrofluorímetro de cubeta	RF-5301 / Shimadzu. Kyoto, Japão
Espectrofluorímetro de placa	Synergy 2, BioTek, USA
Espectrofotômetro	Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 VIS
Leitor de Elisa	Anthos 2010 / Biochrom
Microscópio de fluorescência	Axio Imager.M2 / Carl Zeiss