



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS GLIAIS
E INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM LESÃO DA MEDULA
ESPINHAL SUBMETIDOS À DANÇA, E EM RATOS WISTAR
SUBMETIDOS AOS PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO
VOLUNTÁRIO E FORÇADO**

Caren Luciane Bernardi

Porto Alegre, RS, Brasil.

2013



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

**PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS GLIAIS
E INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES COM LESÃO DA
MEDULA ESPINHAL SUBMETIDOS À DANÇA, E EM RATOS
WISTAR SUBMETIDOS AOS PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO
VOLUNTÁRIO E FORÇADO**

por

Caren Luciane Bernardi

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Neurociências**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves

Porto Alegre, RS, Brasil.

2013

AGRADECIMENTOS

Ao longo destes 4 anos de Doutorado venho pensando em todas as palavras que gostaria de dizer ao finalizar esta Tese e, neste momento, percebo que qualquer coisa que seja dita será insuficiente para demonstrar toda a gratidão que sinto. Como dizia o poeta "somos anjos de uma asa só", e eu tenho certeza de que estas pessoas citadas abaixo foram fundamentais ao emprestar a sua asa para que eu alçasse voo. Obrigada:

Prof. Carlos Alberto Gonçalves, pois com sua generosidade tornou este sonho possível. Obrigada por ter acreditado em mim e aceitado me orientar, obrigada por ter me deixado livre para fazer minhas escolhas e por ter me dado força e ajudado sempre que precisei. Obrigada por ser mais que mestre, por ser meu amigo e por ter me dado o prazer de participar de um dos mais importantes momentos de sua vida. Obrigada por ter me ensinado que é preciso ter muito mais do que conhecimento para ser um grande mestre; é preciso ter sabedoria, e isto tens de sobra! Enfim, obrigada por ser minha fonte de inspiração!!!!

Aos **membros da Banca Avaliadora** pela disponibilidade. Em especial ao **Prof. Jocemar Ilha**, por ter me apresentado ao Prof. CA e, com isto, ter mudado a minha vida; e à **Prof. Carmem Gottfried** pelos ensinamentos e por ter me contagiado com o seu amor pela Glia.

Aos meus pais **Marino Bernardi** (*in memorian*) e **Maria Bernardi**, por terem me dado todo amor que alguém é capaz de receber, por terem feito absolutamente tudo o que estava ao alcance de vocês para me fazer feliz, por terem me ensinado o valor imensurável do estudo, da perseverança e do bem, mostrando na prática que podemos realizar os nossos sonhos através de atitudes dignas e muita determinação. Foi esta "bagagem" e o apoio constante ao longo destes anos de Doutorado que me deram força para ir atrás da realização deste grande sonho de ser Neurocientista. E mãe, a falta do pai nestes últimos 2 anos foi inestimável, mas obrigada por teres feito o papel de pai e mãe, me incentivando todos os dias a seguir em frente e a acreditar que tudo daria certo!

Gustavo Dorneles Ferreira, por ter entrado junto comigo nesta jornada, por ter dividido todos os bons e maus momentos, por ter me dado o teu ombro e coração e por ser meu porto seguro. Obrigada por ter ajudado MUITO na parte prática deste trabalho e por ter me salvado de todos os "apuros" que enfrentei. Obrigada por ser meu melhor amigo, meu amor e por não ter desistido de mim em meio aos "surto"s de estresse e ansiedade. Tua força e apoio foram fundamentais para a conquista deste título.

Um MUITO OBRIGADA mais do que especial à **Ana Carolina Tramontina**, **Ana Paula Costa**, **Krista Wartchow** e **Regina Biasibetti** por terem me mostrado o que é um laboratório de pesquisa, por terem me apresentado a cada proveta e pipeta e por terem me iniciado no caminho científico. Serei grata infinitamente por tudo o que fizeram por mim. Obrigada pela paciência, pela compreensão, pelo carinho, pelo apoio e por terem me ensinado a perceber que não nascemos sabendo, mas que com determinação, humildade e perseverança, no final "a gente chega lá". E, obviamente, pela amizade!!!

Patrícia Nardin, por ter feito uma revolução na minha vida científica ao fazer *workshops* para me ensinar as técnicas bioquímicas, por ter participado diretamente de todos os meus trabalhos, por ter me ensinado e ajudado em todos os momentos. Por ter sido uma amiga de todas as horas, companheira, verdadeira e "de fé"!

Ao meu Presentão de Doutorado, **Regina Biasibetti!!!** Não tenho palavras para dizer o quanto a tua amizade foi importante para mim ao longo destes anos e o quanto eu me senti amada e compreendida por ti! Obrigada por me aceitar como sou e por me amar mesmo assim. Além da ajuda científica, foi contigo que vivi os momentos mais prazerosos e inesquecíveis ao longo destes anos, e claro, os momentos deliciosos na "lanchera" do Parque, além de ter dividido minhas angústias e incertezas da vida cubana. Obrigada por sempre estar lá, toda semana, disposta a enviar uma palavra de carinho e de força e me dar apoio nestes meses de solidão e saudade. E por estar na minha vida!

Obrigada **Adriana Vizuite** e **Lucas Tortorelli** pela parceria com o LPS nestes 2 últimos anos, apoio técnico e científico, além dos momentos de diversão e alegria que compartilhamos!!! E Lucas, pelas nossas "loucuras caridosas" na Penitenciária Madre Pelletier e na Creche Só Bebê, fontes de muita aprendizagem em todos os sentidos.

Patrícia Sesterheim, pessoa maravilhosa que eu amei desde o primeiro momento. Obrigada pelo apoio técnico no biotério sempre que precisei e pelo teu empenho em fazer o melhor pelo nosso biotério e, conseqüentemente, pelas nossas pesquisas. Obrigada, mil vezes obrigada, pela tua amizade verdadeira e completa! Obrigada pelo privilégio de ser tua dinda (e do CA) e fazer parte da tua história! Obrigada pelo teu apoio nos momentos mais difíceis e pela tua maravilhosa companhia nos momentos mais alegres! A viagem da "nossa família" à Cuba ficará para sempre no meu coração!

Cristiane Batassini, pela ajuda nos experimentos e pela parceria nas "viagens científicas". Por ser uma ótima companheira de viagem e uma grande amiga para todos os momentos!!!

Jaqueline Souza, por ser minha "irmã-gêmea" e por todo apoio e amizade ao longo destes 4 anos, que foi fundamental para que eu me sentisse "normal". E pela ajuda nos experimentos. És presença fundamental na minha vida, sempre!!!

Larissa Bobermin, **André Quincozes-Santos** e **Maria Cristina Guerra** pela ajuda na realização deste trabalho e pela amizade!

Nínive, pela ajuda diária no biotério, pela paciência em me ensinar "as coisas" quando cheguei e pelo constante apoio, ao longo dos 2 primeiros anos, com "as gaiolas".

Aos demais **colegas do Lab 33** por terem me acolhido, por absolutamente sempre terem me tratado com atenção e gentileza, por terem me ajudado em tudo o que precisei e por terem tornado felizes estes meus anos de Doutorado.

Dra. Maria de los Ángeles Robinson pela acolhida e apoio durante o trabalho realizado em Cuba; e à **Dra. Marianela Suárez** por ter possibilitado o trabalho no Hospital de Reabilitação Júlio Diaz.

Aos meus queridos **alunos de dança** que, além de permitirem a realização do meu sonho de investigar cientificamente os efeitos da dança sobre a lesão medular, me proporcionaram alguns dos momentos mais felizes e emocionantes da minha vida! Meu imenso e eterno muito obrigada!

Aos meus **amigos e familiares** por terem entendido minhas ausências e falta de tempo, por terem sempre me incentivado a seguir em frente e, principalmente, por não terem desistido de mim!

Aos **funcionários** do PPG Neurociências e PPG Bioquímica pelo auxílio durante este período.

Ao **PPG Neurociências e PPG Bioquímica, CNPq e UFRGS** por terem permitido e contribuído para a minha formação.

"Eu amo a ciência, e é doloroso para mim pensar que muitos estão apavorados com o assunto ou sentem que escolher a Ciência significa que você não pode escolher também a compaixão, ou a arte, ou ser extasiado por natureza. A ciência não se destina a curar-nos do mistério, mas destina-se a reinventá-lo e revigorá-lo."

—Robert Sapolsky, *Why Zebras Don't Get Ulcers*, p. xii

Nota da autora: este trecho citado de Sapolsky foi traduzido e retirado de Levitin (2006).

Levitin, D.J., This is your brain on music : the science of a human obsession. USA: Penguin Group (USA) Inc, 2006.

RESUMO

Os objetivos principais desta tese foram avaliar parâmetros bioquímicos gliais, inflamatórios e comportamentais em pacientes com lesão medular (LM) submetidos a um protocolo de dança, e em ratos submetidos aos protocolos de exercício voluntário e forçado. Para tanto, foram realizados 4 experimentos. No primeiro, os ratos foram submetidos a 4 semanas de exercício moderado em esteira ergométrica (20 min por dia). No segundo, os animais foram submetidos à 4 semanas de exercício voluntário em rodas de correr (12 horas por dia). No terceiro experimento, os ratos foram expostos à esteira ergométrica durante 2 semanas (20 min/dia) e, após o último treino, receberam uma injeção intraperitoneal de LPS. Neste último, a memória e aprendizagem dos animais foram investigadas. Ao término do período de exercício, ou após a injeção de LPS, as análises bioquímicas do hipocampo foram realizadas. O quarto experimento foi realizado com indivíduos com LM que foram submetidos a 4 semanas de dança. Análises sorológicas e comportamentais foram efetuadas. Os resultados mostraram que o exercício forçado promoveu o aumento da glutamina sintetase (GS) e diminuição de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e óxido nítrico (NO) no hipocampo, além de aumentar os níveis de corticosterona, o que pode estar mediando os efeitos do exercício sobre os astrócitos. O exercício voluntário induziu o aumento da GS e BDNF. A aplicação de LPS promoveu aumento dos níveis de TNF- α no hipocampo dos animais, o que coincidiu com o aumento dos níveis de S100B no fluído cerebrospinal. Os indivíduos com LM submetidos à dança apresentaram melhora significativa nos escores da Medida de Independência Funcional, Índice de Barthel, Escala de Berg e Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão, e aumento dos níveis sorológicos de BDNF. A dança não teve efeito sobre os parâmetros gliais, metabólicos e inflamatórios periféricos. Estes resultados sugerem que diferentes tipos de exercício físico exercem diferentes efeitos sobre os astrócitos hipocâmpais, o que pode interferir na indicação de um ou outro dependendo do objetivo a ser alcançado. O exercício em esteira pode ser uma atividade indicada para prevenção de doenças que envolvem neuroinflamação, e a dança pode ser uma intervenção terapêutica eficaz para reabilitação de indivíduos com lesão medular uma vez que contribui para melhora física e psicológica desta população. Tomados juntos, os resultados desta Tese ressaltam a importância da prática de exercício físico para o metabolismo neural, e a relevância de estudar os astrócitos para compreensão dos mecanismos envolvidos no efeito do exercício físico no SNC.

Palavras-chave: exercício físico; astrócitos; neuroinflamação; LPS; dança; lesão medular; neuroplasticidade.

ABSTRACT

The main aim of this Thesis was to evaluate the biochemical glial, inflammatory and behavioral parameters, in patient with spinal cord injury (SCI) submitted to a protocol of dance, and in rats submitted to voluntary and forced exercise. Four experiments were made. In the 1st, the rats were submitted to 4 weeks of moderate exercise on treadmill (20 min per day). In the 2nd, the animals were submitted to 4 weeks of voluntary exercise on wheel running (12 hours per day). In the 3rd experiment, the rats were exposed to treadmill during 2 weeks (20 min per day) and, after the last session, they received intraperitoneal injection of LPS. In this last experiment, the memory and learning were investigated. At the finish of the exercise period, or after the LPS injection, the biochemical analysis of the hippocampus was realized. The 4th experiment was realized with individuals with spinal cord injury that were submitted to 4 weeks of dance practice. Behavioral and serological analyses were performed. Data show that treadmill running increased glutamine synthetase (GS) activity and decreased hippocampal glial fibrillary acidic protein (GFAP) and nitric oxide (NO), as well as increased corticosterone level, that can mediate the effects of the exercise on astrocytes. The voluntary exercise increased GS and BDNF. The LPS administration increased hippocampal TNF- α level in rats concomitantly with the increase in the S100B levels in cerebrospinal fluid. The individuals with spinal cord injury submitted to dance showed a significant improve in the scores of Functional Independency Measure, Barthel Index, Berg Scale and Anxiety and Depression Hospitalar Scale, and a increase in the serologic levels of BDNF. The dance had no effect on glial, metabolic and inflammatory parameters. These results suggest that different types of exercise exert different effects on hippocampal astrocytes, which may interfere with the appointment of one or the other depending on the objective to be achieved. The treadmill exercise can be a good strategy in the prevention of neuroinflammatory diseases, and dance can be an effective therapeutic intervention for rehabilitation of individuals with SCI as it helps to improve physical and psychological conditions in this population. Taken together, the present data highlight the importance of physical exercise for neural functions, and the relevance of studying astrocytes to understand the mechanisms involved in the effect of exercise on CNS.

Key-words: physical exercise; astrocytes; neuroinflammation; LPS; dance; spinal cord injury; neuroplasticity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASIA	American Spinal Cord Injury Association
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira hematoencefálica
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CSF	Fluido cerebrospinal
CT	Colesterol total
CORT	Cortisol
FIM ou MIF	Medida de independência funcional
GLI ou GLU	Glicose
GS	Enzima glutamina sintetase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GLT 1	Transportador de glutamato glial 1
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLUT 1	Transportador de glicose 1
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HADS	Escala hospitalar de ansiedade e depressão
IL-2R	Receptor de interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IGF 1	Fator de crescimento semelhante à insulina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
LPS	lipopolisacarídeo
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LAM	Labirinto aquático de Morris
LME	Lesão da medula espinhal
LM	Lesão medular
MBP	Proteína básica da mielina
ME	Medula espinhal

NT 3	Neurotrofina 3
NGF	Fator de crescimento do nervo
NO	Óxido nítrico
NFkB	Fator nuclear kappa B
PCR	Proteína C-reativa
RAGE	Receptor de produtos finais avançados de glicação
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SD	Desvio padrão
SNC	Sistema nervoso central
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TLR	Receptor Toll-like
TG	Triglicerídeos

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
Objetivos	19
Objetivo Geral.....	19
Objetivos Específicos	19
CAPÍTULO I - Referencial Teórico	20
1.1 Exercício Físico	21
1.2 Modelos Experimentais de Exercício Físico	23
1.3 Astrócitos nas condições de saúde e doença	25
1.4 Modelo experimental de inflamação no SNC induzida por administração sistêmica de LPS	29
1.5 Lesão Medular	32
1.5.1 Classificação Neurológica da Lesão Medular	36
1.6 Lesão Medular e Exercício Físico	37
1.7 A Dança como estratégia terapêutica para a Lesão Medular	38
CAPÍTULO II - Resultados	41
Artigo I	42
<i>Treadmill exercise induces hippocampal astroglial alterations in rats</i>	
Artigo II	54
<i>Physical exercise and astrocytes: a sistematic review</i>	
Artigo III	87
<i>Physical exercise reduces LPS-induced TNF-alpha increment in Wistar rats</i>	
Artigo IV	120
<i>Effect of dance on glial, metabolic and immunological biochemical Parameters, functional independence and emotional state of individuals with chronic spinal cord injury</i>	
CAPÍTULO III - Discussão geral	126
3.1 Efeito do Exercício físico (forçado e voluntário) sobre os astrócitos no SNC intacto: o papel da corticosterona e do BDNF	127
3.2 Efeito do Exercício Físico (esteira ergométrica e Dança) sobre os astrócitos e outros parâmetros, no SNC danificado	136
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	151
REFERENCIAS	154

INTRODUÇÃO GERAL

A afirmação de que a atividade física contribui para a manutenção da saúde do corpo e da mente é bastante corriqueira, porém, do ponto de vista científico, ainda são necessários mais estudos para compreensão de seus efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC). Pesquisas tem mostrado que a prática de exercício físico associada a alimentação saudável, contendo frutas e vegetais, diminui o risco de doenças cardiovasculares, metabólicas e metastáticas (van Praag, 2009). Estudos apontam para os benefícios do exercício em relação a aprendizagem e memória, proteção de neurodegeneração e alívio da depressão, particularmente na população idosa. Já foi mostrado que o exercício aumenta a plasticidade sináptica através de modificações estruturais e potenciação da força sináptica, e através do fortalecimento de sistemas que dão suporte à plasticidade, incluindo a neurogênese, o metabolismo e a função vascular. Tais alterações estruturais e funcionais induzidas pelo exercício físico têm sido relatadas em várias regiões cerebrais, mas a estrutura melhor estudada e compreendida é o hipocampo (Cotman et al., 2007).

Nos últimos anos, muitos estudos sobre exercício e cognição têm sido realizados utilizando roedores. Estas pesquisas atestam os benefícios do exercício físico sobre a função neural e tem sugerido alguns mecanismos que podem embasar os efeitos celulares e moleculares promovidos pela atividade física. Fundamentalmente, dois tipos de exercício são utilizados nas pesquisas experimentais: o exercício forçado onde os animais são submetidos à esteira ergométrica com os parâmetros de corrida (velocidade e tempo) definidos pelo experimentador; e o exercício voluntário onde os animais são expostos a uma roda de correr podendo acessar o aparato de acordo com sua vontade. Ambos os tipos de exercício parecem melhorar a memória e aprendizagem em diversos testes comportamentais (van Praag, 2008) dependentes (Liu et al., 2008; O'Callaghan et al., 2007) ou não do hipocampo (Greenwood et al., 2003). Contudo, ainda é necessário determinar se os exercícios forçado e voluntário são equivalentes, pois têm sido relatados diferentes efeitos comportamentais e celulares promovidos por estes dois tipos

de atividade física, mesmo quando utilizados protocolos (duração, frequência, tempo de exposição) semelhantes (Leasure and Jones, 2008).

Embora muito progresso tenha sido feito em estudos animais, existe a necessidade de rigorosos ensaios clínicos utilizando o exercício físico como intervenção preventiva/terapêutica que podem ser guiados por este conhecimento adquirido em modelos animais. Estes estudos clínicos podem contribuir para que a frequência e os tipos de exercício que resultam em benefícios funcionais possam ser definidos e para identificar e orientar mecanismos pelos quais o exercício pode atuar sinergicamente com medicamentos e/ou outras terapias essenciais, aumentando os efeitos observados com qualquer uma destas intervenções isoladamente (Cotman et al., 2007).

Em paralelo com estudos clínicos, estudos experimentais tem mostrado que o exercício físico melhora a função em diversos modelos animais de doenças neurodegenerativas como, por exemplo, o atraso do início dos sintomas e retardo do declínio cognitivo em camundongos transgênicos para Doença de Huntington (Minghetti, 2004), e melhora da aprendizagem e memória espacial em modelos de camundongos transgênicos para Doença de Alzheimer (Phillis et al., 2006). Além disso, o exercício físico é reconhecido como uma importante estratégia para reduzir o risco de doenças crônicas periféricas e centrais. Um dos mecanismos-chave que medeiam estes amplos efeitos benéficos do exercício sobre o SNC é a indução de fatores de crescimento centrais e periféricos como, por exemplo, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), o qual influencia as mudanças estruturais e funcionais neste sistema.

Recentes pesquisas têm demonstrado o papel do exercício físico sobre a melhora do perfil inflamatório (Leem et al., 2011). A inflamação sistêmica pode interferir com a sinalização dos fatores de crescimento na periferia e no SNC e o exercício físico pode melhorar esta sinalização através da redução das condições pró-inflamatórias e diretamente aumentando os níveis dos fatores de crescimento. Em condições desreguladas, a inflamação é um processo chave na patogênese de várias doenças neurodegenerativas como Doença de Parkinson e Doença de Alzheimer (Akiyama et al., 2000; McGeer and McGeer, 2008) e a persistente inflamação subclínica, como indicado por altos níveis circulantes de mediadores inflamatórios, é um fator de risco proeminente para diversas doenças crônicas, bem como para alterações decorrentes do envelhecimento. Portanto, a via inflamatória é um potencial alvo terapêutico e o

exercício físico parece exercer um importante papel na melhora do perfil inflamatório, sendo uma relevante estratégia para redução do risco e tratamento de doenças crônicas.

Do ponto de vista experimental, um modelo bastante utilizado para investigação dos efeitos da inflamação no SNC é a administração sistêmica de lipopolissacarídeo (LPS) (Hauss-Wegrzyniak et al., 1998). O LPS é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas que induz uma profunda resposta imunoestimulatória e inflamatória (Hennigan et al., 2007). A injeção periférica de LPS induz déficits funcionais no SNC, incluindo a inibição da expressão de potenciação de longa duração (*long-term potentiation*, LTP) (Vereker et al., 2000) e formas de aprendizagem dependentes do hipocampo (Shaw et al., 2001). Pesquisas sugerem que as consequências negativas do LPS sobre a função sináptica são devidas aos efeitos neurodegenerativos causados pela ativação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) (Barry et al., 2005; Vereker et al., 2000). Além disso, tem sido proposto que o LPS pode afetar a expressão de neurotrofinas como o fator de crescimento neuronal (*neuronal growth factor*, NGF) e o BDNF (Guan and Fang, 2006), e seus receptores no SNC e que esta ação pode contribuir para o comprometimento funcional observado após a injeção de LPS (Hennigan et al., 2007). O processo inflamatório gerado no SNC é mantido principalmente pela microglia e astrócitos (Trendelenburg, 2008) e pode ser responsável pela indução de morte neuronal (Lucas et al., 2006).

Dentre as patologias neurológicas que envolvem processos inflamatórios crônicos podemos citar a Lesão na Medula Espinhal (LME). Uma variedade de condições patológicas podem afetar tanto a estrutura quanto a função da medula espinhal. Estas condições variam desde distúrbios crônicos a danos agudos ocasionados por trauma físico. As lesões da medula espinhal interrompem a informação descendente do encéfalo para os níveis medulares abaixo da lesão, bem como a informação ascendente das estruturas sensoriais causando importante prejuízo motor e sensorial caudal ao nível da lesão (Ilha, 2011).

A inatividade física é bastante frequente nesta população, podendo contribuir para o aumento dos níveis de colesterol e triglicerídeos (TG) sanguíneos e diminuição dos níveis da lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*, HDL). As doenças cardiovasculares têm sido mostradas ser a principal causa de morte em pacientes com lesão da medula espinhal. Vários estudos têm enfatizado a existência de uma resposta inflamatória de baixa-intensidade em indivíduos com lesão medular

crônica sem infecção ativa. Pesquisas têm estudado a resposta inflamatória e autoimune imediatamente após o trauma medular, porém, pouco é conhecido sobre o estado imunológico crônico dos indivíduos com esta patologia. Alguns estudos demonstraram que pacientes com lesão traumática da medula espinhal de longa duração apresentam aumento de células-T reativas para proteína básica da mielina (*myelin basic protein*, MBP) (Kil et al., 1999); elevação dos níveis sorológicos do receptor-2 de interleucina (IL-2R), moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), e interleucina-6 (IL-6) (Segal and Brunnemann, 1993; Segal et al., 1997). Outros trabalhos mostraram que os níveis de autoanticorpos e citocinas inflamatórias no soro de pacientes com lesão medular crônica sugerem que estes indivíduos exibem atividade imune humoral permanente (Hayes et al., 2002). Também tem sido descrito que os níveis sorológicos de citocinas próinflamatórias, como interleucina-2 e TNF α em indivíduos com lesão da medula espinhal crônica, livres de infecção, estão aumentados (Hayes et al., 2002).

Além de promover alterações inflamatórias periféricas, novas evidências em animais indicam que a perda de informações da medula espinhal para o cérebro pode promover profundas modificações funcionais nos centros cerebrais, tais como rápidas mudanças na atividade eletrofisiológica espontânea de redes neuronais (Aguilar et al., 2010). Pesquisas recentes indicaram que lesões na medula espinhal podem afetar sistemas moleculares importantes para a plasticidade sináptica no encéfalo (Fumagalli et al., 2009; Lau et al., 2011). Um estudo mostrou que a lesão medular reduziu os níveis de BDNF e proteínas relacionadas no hipocampo, indicando que o cérebro também é afetado pela patologia na medula espinhal (Gomez-Pinilla et al., 2012). Estes resultados evidenciam uma resposta coordenada do cérebro e medula na lesão da medula espinhal. Este mesmo trabalho mostrou que o exercício físico realizado antes do início da lesão apresentou uma ação protetora no hipocampo e na medula espinhal, evidenciada através da capacidade de conter a redução da maioria dos sistemas moleculares relacionados a lesão que estavam sob estudo. Os achados desta pesquisa enfatizam a capacidade do exercício de recrutar adaptações moleculares que podem aumentar a plasticidade no cérebro e medula espinhal (Gomez-Pinilla et al., 2012).

Em resumo, tanto as patologias neurodegenerativas quanto as lesões crônicas no SNC têm como base um processo inflamatório central associado a alterações nos mecanismos de plasticidade sináptica que levarão à alterações funcionais e cognitivas.

Os astrócitos no SNC apresentam um papel fundamental na regulação da plasticidade sináptica e na formação das sinapses (Bracchi-Ricard et al., 2008), além de

servir como ponte entre o SNC e o sistema imune (Wang and Bordey, 2008). As respostas inflamatórias no SNC são primariamente mediadas pela microglia, mas crescentes evidências sugerem a crucial importância dos astrócitos neste processo. Estas células comunicam-se extensivamente com os neurônios e são consideradas como parte integral das sinapses, as então denominadas "sinapses tripartite" (Araque et al., 1999; Auld and Robitaille, 2003; Newman, 2003; Perea and Araque, 2005). Os astrócitos apresentam funções fundamentais na regulação da homeostase e desenvolvimento, provendo suporte metabólico e trófico para os neurônios (Ambrosini and Aloisi, 2004), participando do metabolismo de neurotransmissores, defesa antioxidante e regulação da concentração extracelular de potássio (Belanger and Magistretti, 2009), bem como promovendo processos de reparo (Ambrosini and Aloisi, 2004). Além disso, estas células podem mediar as principais respostas inflamatórias do SNC e podem ser ativadas durante alguns processos patológicos e promover proteção para os neurônios (Sofroniew, 2005). Contudo, a excessiva ativação glial pode ser danosa e pode promover a morte neuronal (Hanisch, 2002). Os astrócitos expressam os receptores Toll-like (*toll-like receptor*, TLR) e respondem aos agonistas TLR através da liberação de moléculas pró-inflamatórias (Gorina et al., 2009; van Noort and Bsibsi, 2009), e podem modular as características das respostas imunes (Dong and Benveniste, 2001; Farina et al., 2007) através da liberação de citocinas e quimiocinas (Wang and Bordey, 2008).

Considerando-se o acima exposto e salientando-se os benefícios da atividade física e a necessidade de buscar alternativas terapêuticas para doenças crônicas e neurodegenerativas, pergunta-se: (1) **qual o efeito do exercício físico forçado ou voluntário sobre os parâmetros bioquímicos gliais e comportamento em ratos Wistar em situação basal e submetidos ao modelo de inflamação sistêmica através da administração de LPS?** (2) **qual o efeito da Dança sobre os parâmetros bioquímicos gliais, inflamatórios e comportamentais em indivíduos com lesão medular crônica?**

Buscando responder a estas questões, esta tese foi estruturada em 3 partes fundamentais: introdução, desenvolvimento e conclusão.

A introdução apresenta a delimitação e problemática do tema, a justificativa e os objetivos do estudo. O desenvolvimento está estruturado em 3 capítulos contemplando o referencial teórico (capítulo I), os artigos científicos (capítulo II) e a discussão do trabalho (capítulo III). Na parte final desta tese são apresentadas as conclusões do

trabalho com vistas a mostrar o alcance dos objetivos propostos e perspectivas para novas pesquisas.

A presente tese justifica-se por buscar uma maior compreensão neurobiológica da plasticidade cerebral promovida pelo exercício físico e por buscar estratégias de prevenção e proteção do SNC contra doenças crônicas de cunho inflamatório. Além disso, este trabalho contribui para aumentar o conhecimento sobre papel desempenhado pelos astrócitos no funcionamento do SNC em condições fisiológicas e patológicas. Avanços neste campo de conhecimento são importantes para a Neurociência e podem contribuir para a integração de diversas áreas de saberes como Medicina, Fisioterapia, Educação Física, entre outros.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivos gerais:

- (i) avaliação de parâmetros comportamentais, bioquímicos gliais e inflamatórios em pacientes com lesão da medula espinhal submetidos à dança.
- (ii) avaliação de parâmetros comportamentais, bioquímicos gliais e inflamatórios em ratos Wistar submetidos aos protocolos de exercício voluntário e forçado.

1.1.2 Objetivos específicos

- (i) Avaliar o efeito de quatro semanas de prática da dança sobre parâmetros comportamentais (nível de independência funcional e estado emocional) e parâmetros periféricos bioquímicos gliais, metabólicos, imunológicos de indivíduos com lesão medular crônica.
- (ii) Investigar os efeitos de 4 semanas de exercício moderado em esteira sobre parâmetros estruturais e de atividade astrocítica (conteúdo de GFAP, atividade da enzima GS, atividades de captação de glutamato e glicose, conteúdo de glutathione, conteúdo e secreção da proteína S100B) no hipocampo de ratos Wistar adultos;
- (iii) Investigar o efeito preventivo do exercício físico em esteira, de intensidade moderada, sobre a ativação dos astrócitos e liberação de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo que podem ocorrer após a administração sistêmica de LPS;
- (iv) avaliar o efeito do LPS e exercício forçado sobre a tarefa comportamental de reconhecimento de objetos em ratos Wistar.
- (v) Investigar o efeito do exercício voluntário sobre parâmetros gliais (conteúdo de GFAP, atividade da enzima GS, atividades de captação de glutamato e glicose, conteúdo de glutathione, conteúdo de S100B) e fator neurotrófico em ratos Wistar.

CAPÍTULO I

Referencial Teórico

2.1 Exercício físico

O exercício físico tem profundos efeitos sobre vários sistemas biológicos humanos, incluindo os sistemas cardiovascular, pulmonar, musculoesquelético e o SNC. Em contraste com o extenso conhecimento sobre as adaptações periféricas do exercício, as informações sobre os efeitos específicos do exercício sobre o SNC são relativamente limitadas.

Há crescentes evidências de que a atividade física regular confere proteção para diversas doenças neurológicas como Doença de Parkinson (Smith and Zigmond, 2003), Doença de Alzheimer (Cotman and Berchtold, 2002) e acidente vascular cerebral isquêmico (Stummer et al., 1994). Além disso, o exercício físico previne o declínio cognitivo durante o envelhecimento (Laurin et al., 2001). Diversos estudos evidenciam que a atividade física regular pode levar a melhora de funções cognitivas como memória, atenção e raciocínio (Chodzko-Zajko and Moore, 1994; Miles and Hardman, 1998)

Dados de pesquisas com humanos são suportados por pesquisas com animais e demonstram que o exercício pode aumentar a sobrevivência neuronal e a resistência a danos cerebrais (Carro et al., 2001; Stummer et al., 1994), promover a angiogênese (Ding et al., 2004; Kleim et al., 2002) e o crescimento vascular (Lange-Asschenfeldt and Kojda, 2008), estimular a neurogênese hipocampal (Garcia-Capdevila et al., 2009; Uda et al., 2006; van Praag et al., 1999b), induzir defesa antioxidante (Eggermont et al., 2006; Lange-Asschenfeldt and Kojda, 2008; Ogonovszky et al., 2005) e aumentar a plasticidade sináptica (Farmer et al., 2004; Garcia-Capdevila et al., 2009).

A ocorrência de neurogênese e plasticidade cerebral no hipocampo parece ser induzida especificamente por famílias de moléculas neurotróficas (Briones, 2006;

Redila and Christie, 2006). A disponibilidade de BDNF parece ser crucial para estes mecanismos. O aumento nos níveis de BDNF hipocampal induzidos pelo exercício (Berchtold et al., 2005; Huang et al., 2006; Vaynman et al., 2004) são controlados pela atividade neuronal e astrocítica, por neurotransmissores e pela interação com fatores periféricos que incluem, por exemplo, a corticosterona/cortisol (Cotman and Berchtold, 2002). A influência periférica ilustra como o exercício pode relacionar o estado geral do corpo ao funcionamento encefálico. O exercício recruta mecanismos de plasticidade dependentes do uso, que preparam o SNC para codificar informações significativas advindas do ambiente e, ao mesmo tempo, ativa mecanismos que protegem o SNC de um possível dano (Cotman and Berchtold, 2002).

Pesquisas experimentais mostraram que o BDNF é essencial para o funcionamento do hipocampo, plasticidade sináptica, aprendizagem e modulação da depressão (Cotman et al., 2007; Duman, 2005).

Atualmente, pesquisas mostram que o exercício físico exerce efeitos terapêuticos através da modulação neuroimune, agindo sobre os mediadores neuroinflamatórios (Eyre and Baune, 2012; Sousa e Silva et al., 2010). Estudos em roedores têm indicado que o exercício físico melhora as condições imunes do SNC através da redução da expressão de TNF- α (Ding et al., 2005). Estudos clínicos sugerem que a redução da inflamação encefálica é um dos efeitos positivos do exercício sobre o funcionamento cognitivo de pacientes que sofrem de doenças neurodegenerativas ou lesão cerebral aguda (Erickson et al., 2007). Além disso, o exercício físico promove a regulação negativa da sinalização do TNF- α que é associada com a melhora do declínio cognitivo em idosos (Nichol et al., 2008; Parachikova et al., 2008; van Praag et al., 2005). Em modelos de isquemia/reperfusão, o pré-condicionamento com exercício protege contra o dano no SNC através da via de transdução do sinal do TNF- α e regulação negativa de seu receptor (Ding et al., 2006). Outros estudos também mostraram que o exercício físico suprime a concentração de TNF- α no plasma de camundongos após a estimulação com LPS (Tanaka et al., 2010). A atividade física também parece reduzir a neuroinflamação na Doença de Alzheimer (Leem et al., 2011).

Dado que a inflamação embasa a fisiopatologia de muitos estados de doença, a redução da neuroinflamação, associada a liberação de fatores tróficos, pode ser um importante mecanismo através do qual a atividade física exerce seus efeitos benéficos sobre as consequências das doenças (Mota et al., 2012).

2.2 Modelos experimentais de exercício físico

A maioria das pesquisas com o objetivo de estudar os efeitos produzidos pelo exercício físico sobre as funções hipocâmpais envolve modelos animais, pela possibilidade de avaliação *in vivo* do tecido nervoso. Os roedores são os principais animais utilizados nestes estudos.

Existem dois paradigmas experimentais de exercício físico utilizados em roedores: o exercício forçado sobre uma esteira ergométrica ou natação, e o exercício voluntário onde os animais acessam livremente as rodas de corrida. Estudos que investigam os mesmos parâmetros produzem diferentes resultados dependendo se é utilizado o paradigma de exercício forçado ou voluntário (Ang and Gomez-Pinilla, 2007). O reconhecimento de que nenhum dos paradigmas de exercício isolado consegue cumprir todas as necessidades terapêuticas (Ang and Gomez-Pinilla, 2007; Cotman et al., 2007) vem sendo explorado recentemente. Estudos tem mostrado que os exercícios forçado e voluntário exercem efeitos diferentes sobre o SNC e comportamento (Ke et al., 2011; Leasure and Jones, 2008). Um estudo mostrou que diferentes cascatas de proteínas estão envolvidas na sinalização celular em ratos idosos sedentários, ratos idosos que realizaram exercício voluntário e ratos idosos forçados a correr sobre uma esteira (Chen et al., 2007). Outras pesquisas mostraram que os exercícios forçado e voluntário afetam diferentemente os neurotransmissores monoaminérgicos (Dishman, 1997), a expressão de parvalbumina (Arida et al., 2004; Arida et al., 2007), a expressão hipocâmpal de BDNF e sinapsina-1 (Ploughman et al., 2005), a longevidade e composição corporal (Narath et al., 2001) e a tarefa comportamental do campo aberto (Burghardt et al., 2004). Além disso, diferentes tipos de exercício mostram exercer diferentes efeitos neuroprotetores sobre modelo animal de isquemia cerebral (Hayes et al., 2008; Ke et al., 2011).

A distância percorrida também é diferente conforme o modelo de exercício utilizado. Os animais que exercitam-se forçadamente são normalmente submetidos a performances de curtas distâncias, enquanto que camundongos e ratos frequentemente correm voluntariamente longas distâncias (Burghardt et al., 2004; Hayes et al., 2008; Kinni et al., 2011; Naylor et al., 2005).

O paradigma de corrida forçada é associado com estresse (Arida et al., 2004). Os ratos são forçados a correr a velocidade da esteira (estipuladas pelo experimentador) e

eles podem receber um choque elétrico leve para estimular a corrida. Pesquisas mostraram que o estresse agudo geralmente afeta o processo de aprendizagem uma vez que experiências emocionalmente excitantes tais como o estresse frequentemente facilitam a formação de memórias mais rapidamente (Christianson, 1992). Este efeito pode ser atribuído a liberação de hormônios adrenais como a epinefrina e o cortisol (corticosterona em ratos) (Ferry and McGaugh, 2000; McEwen, 2000). Então, a elevação dos hormônios do estresse associados a corrida em esteira pode ser a razão pela qual os corredores adquirem melhor habilidade de memória e aprendizagem (Ang et al., 2006).

Um estudo mostrou que o exercício forçado aumentou os níveis de corticosterona em ratos e foi neuroprotetor, enquanto o estresse isolado não teve o mesmo efeito, o que sugere uma combinação benéfica da atividade física e estresse (Hayes et al., 2008). Por outro lado, o estresse prolongado ou altos níveis de estresse resultam na supressão da neurogênese no giro denteado do hipocampo (Gould et al., 1997; McEwen, 2000). O exercício físico com altos níveis de estresse mostrou exercer efeito nulo ou prejudicial sobre habilidades cognitivas (Blustein et al., 2006) e induzir sintomas fisiológicos como hipertrofia adrenal, elevação dos níveis basais de corticosterona e imunossupressão (Moraska et al., 2000).

Muitas pesquisas que mostram a ação benéfica do exercício sobre o SNC tem se baseado no paradigma voluntário (Anderson et al., 2000; Neeper et al., 1996; van Praag et al., 1999a). A corrida voluntária é conhecida por facilitar a neuroplasticidade e aumentar a neurogênese e aprendizagem em modelos experimentais (van Praag et al., 1999a). Contudo, os mecanismos através dos quais o exercício voluntário afeta a estrutura e função do SNC são amplamente desconhecidos (Ang and Gomez-Pinilla, 2007). Provavelmente isto acontece porque neste modelo de exercício, a distância percorrida e a velocidade variam dependendo da vontade, espécie (camundongo ou rato) e raça do animal, tornando difícil comparar os resultados entre as pesquisas. Um aspecto positivo do exercício voluntário em rodas de correr é que ele evita possíveis efeitos de confusão do exercício forçado como a adaptação crônica ao estressor (Moraska et al., 2000). Além disso, a corrida voluntária possui o importante efeito de ser recompensadora (Greenwood and Fleshner, 2008; Werme et al., 2002).

Portanto, há consideráveis evidências suportando que o exercício, independentemente de ser forçado ou voluntário, pode ajudar a melhorar a memória e aprendizagem. O desafio está em conhecer os mecanismos celulares e moleculares

através dos quais os exercícios forçado e voluntário influenciam as funções do SNC e reconhecer a relativa contribuição de cada um destes paradigmas nestas funções (Lista and Sorrentino, 2010).

2.3 Astrócitos

Inicialmente considerava-se que a sinalização intercelular no SNC ocorria exclusivamente entre os neurônios. Atualmente, há o reconhecimento da existência de mais uma célula nesta transferência e processamento de informações: os astrócitos, estabelecendo o conceito de sinapse tripartite (Perea et al., 2009). Os astrócitos são encontrados através do cérebro e medula espinhal e, em relação ao número, área de superfície e volume, são o tipo celular glial predominante no SNC (Agulhon et al., 2008). Estas células tem um importante papel em aspectos chaves do desenvolvimento e função do SNC, tais como metabolismo neuronal, sinaptogênese, homeostase do ambiente extracelular e microcirculação cerebral (Araque and Navarrete, 2010; Perea et al., 2009). Os astrócitos respondem à atividade neuronal e regulam a transmissão e plasticidade sináptica; eles estão envolvidos no processamento, transferência e armazenamento de informação no SNC (Perea and Araque, 2010).

Astrócitos individuais são conectados uns aos outros por junções comunicantes (*gap junctions*) funcionando como um sincício que contata todos os outros elementos celulares no SNC, incluindo neurônios, oligodendrócitos, microglia e vasculatura (Agulhon et al., 2008). Os astrócitos são capazes de liberar gliotransmissores como glutamato, ATP e D-serina (figura 1). Estes gliotransmissores ligam-se aos receptores neuronais pré e/ou pós-sinápticos e modulam a atividade sináptica (Bezzi et al., 1998; Fiacco and McCarthy, 2004; Navarrete and Araque, 2008).

Além da relação funcional bi-direcional entre astrócitos e neurônios, os astrócitos tem outras atividades incluindo o controle de neurotransmissores e homeostase de íons/água (Butt and Kalsi, 2006; Simard and Nedergaard, 2004), a manutenção da integridade da barreira hematoencefálica (Abbott et al., 2006; Hawkins and Davis, 2005), o controle do fluxo sanguíneo cerebral local (Gordon et al., 2007; Iadecola and Nedergaard, 2007), a contribuição para neuroinflamação e imunidade (Dong and Benveniste, 2001; Farina et al., 2007), para a neuropatologia (Leis et al., 2005; Panickar and Norenberg, 2005; Seifert et al., 2006) e para o reparo e formação de cicatriz (Pekny and Nilsson, 2005; Silver and Miller, 2004).

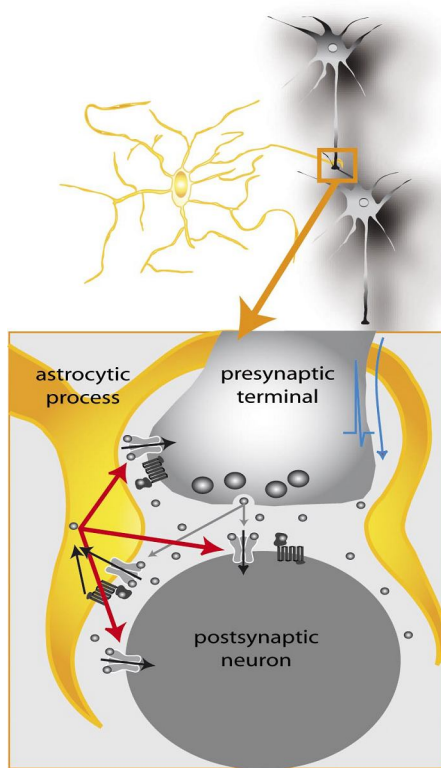


Figura 1. Os astrócitos contribuem para a transmissão na sinapse tripartite. O glutamato liberado na fenda sináptica (setas cinza) estimula os receptores ionotrópicos e metabotrópicos nos astrócitos. Isto ativa vias intracelulares (setas pretas) levando a liberação de gliotransmissores (setas vermelhas) que, por sua vez, atuam nos receptores pré e pós-sinápticos (Theodosios et al., 2008).

Em relação ao seu papel na neuroinflamação e imunidade, pesquisas mostram que os astrócitos, ao lado das células microgliais, são as células residentes no SNC responsáveis pela resposta imunológica. Os astrócitos são capazes de produzir numerosas citocinas pró e anti-inflamatórias, incluindo uma variedade de interleucinas, fator de necrose tumoral e interferons. Cada uma destas citocinas pode ter vários efeitos dependendo da célula alvo (Gee and Keller, 2005).

Os astrócitos secretam fatores neurotróficos que são potentes fatores de sobrevivência para várias populações neuronais. O fator neurotrófico derivado da glia (*glial-derived neurotrophic factor*, GDNF) e o BDNF exercem forte influência sobre o crescimento, desenvolvimento e proteção de neurônios em condições normais e patológicas (Cunningham and Su, 2002; Petrova et al., 2003; Petrova et al., 2004; Sandhu et al., 2009). Entre os fatores tróficos secretados pelos astrócitos está a proteína S100B, que é exclusivamente produzida e secretada pelos astrócitos no SNC (Tramontina et al., 2006). A S100B é uma proteína ligante de cálcio que tem atividade neurotrófica a níveis nanomolares no meio extracelular (Donato, 2003; Van Eldik and Wainwright, 2003). Um estudo em cultura de neurônios serotoninérgicos de ratos mostrou que o BDNF aumenta a área do soma, enquanto que a S100B promove o crescimento

total de neuritos (Nishi et al., 2000). Outra pesquisa mostrou que camundongos *knock out* para S100B apresentaram aumento dos níveis de BDNF hipocampal comparado com os controles selvagens. Este aumento do BDNF pode representar um mecanismo endógeno para compensar a perda dos efeitos tróficos da proteína S100B (Schulte-Herbruggen et al., 2008).

A S100B possui ações parácrinas e autócrinas, tanto intra quanto extracelulares, sobre neurônios e sobre outros astrócitos (Rothermundt et al., 2003). Dentre estas ações, estão a regulação da proliferação, diferenciação e morfologia celular, homeostase do Ca^{2+} , fosforilação e transcrição de proteínas, atividade enzimática e metabolismo (Donato et al., 2009; Goncalves et al., 2008). Tais efeitos são mediados, em parte, pela interação da S100B com o receptor para produtos finais avançados de glicação (*advanced glycation end products*, RAGE), um receptor multiligante, envolvido na transdução de estímulos inflamatórios e de diversos fatores neurotróficos e neurotóxicos (Donato, 2001; Donato, 2003). Estudos *in vitro* demonstram que a proteína S100B pode também ter efeitos neurotróficos e neurotóxicos, dependendo da sua concentração e circunstâncias. Em concentrações pico a nanomolares, estimula o crescimento de neuritos, promovendo a sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento; enquanto que, em concentrações micromolares, desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, podendo levar à morte neuronal por apoptose (Van Eldik and Wainwright, 2003). Estudos *in vivo* e com animais transgênicos mostram a importância da S100B para o crescimento neurítico e para processo de aprendizagem e memória (Mello e Souza et al., 2000; Whitaker-Azmitia et al., 1997).

As células astrocíticas são as principais responsáveis pelo transporte de glutamato, regulando seus níveis extracelulares através de transportadores dependentes de sódio (GLAST e GLT-1). A captação de glutamato pelos astrócitos é o principal mecanismo para remoção do neurotransmissor do meio extracelular e finalização da sua ação (Rothstein et al., 1996), visto que o acúmulo de glutamato no espaço extracelular é tóxico para as células do SNC (Chen et al., 2000; Matute et al., 2002). Ademais, a enzima glutamina sintetase (GS), presente nos astrócitos, catalisa a reação de amidação do glutamato, captado por estas células, para formar glutamina, a qual é exportada para os neurônios, permitindo a síntese não somente de glutamato, mas também do ácido gamaaminobutírico (*gamma-aminobutyric acid*, GABA) através do ciclo glutamato-glutamina (Bak et al., 2006) (Figura 2).

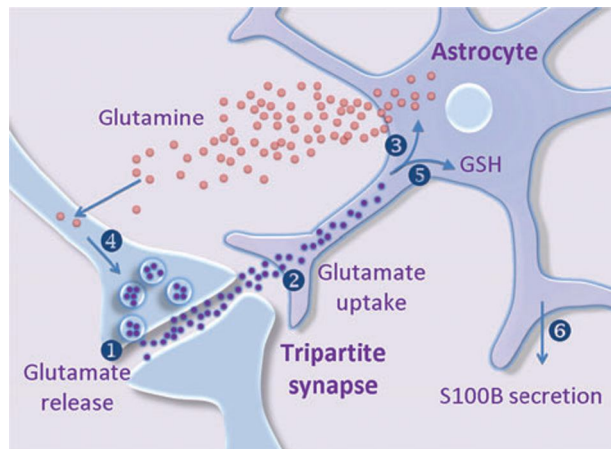


Figura 2. Após a liberação de glutamato na fenda sináptica (1), o glutamato é captado pelos astrócitos (2) e, então, é convertido em glutamina pela atividade da enzima glutamina sintetase (3). A glutamina é liberada para o espaço extracelular e captada pelos neurônios para ser reconvertida em glutamato (4). O glutamato captado pelos astrócitos também é utilizado na síntese de glutatona (5). Os astrócitos também são capazes de produzir e secretar a proteína S100B (6) (Quincozes-Santos and Gottfried, 2011).

A captação de glutamato pelos astrócitos é também essencial para a manutenção dos níveis de glutatona, o principal antioxidante do SNC (Dringen, 2000). Os astrócitos produzem e secretam a glutatona (Dringen et al., 1999). Para a efetividade de tal papel antioxidante, é necessário um equilíbrio entre as formas oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) da glutatona, bem como da quantidade sintetizada e do consumo e transporte para outras células (Hirrlinger and Dringen, 2010). A GSH age de maneira enzimática ou não enzimática na conversão do peróxido de hidrogênio em água, neutralizando esta espécie reativa de oxigênio.

Outra função astrocítica importante é a sua participação no metabolismo energético do SNC (Rossi and Volterra, 2009). A glicose é a principal fonte energética para os neurônios e os astrócitos são responsáveis por captá-la a partir da circulação sanguínea e favorecer sua entrada no parênquima cerebral. Dentro dos astrócitos, a glicose é utilizada para a síntese de glicogênio (como fonte energética), que é armazenado nesta célula ou convertido, via glicólise anaeróbica, em lactato, o principal substrato metabólico para os neurônios (Tsacopoulos and Magistretti, 1996). Estudos realizados em pintos tem estabelecido que o metabolismo astrocítico da glicose, glicogênio e glutamato é crucial durante a aprendizagem (Gibbs et al., 2008).

Muitas técnicas imuno-histoquímicas são criadas para detecção de marcadores moleculares específicos a nível de uma única célula. Para identificação dos astrócitos, os estudos utilizam a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (Pekny and

Pekna, 2004). Esta proteína é o principal filamento intermediário de astrócitos maduros do SNC (Eng et al., 2000). É a principal, porém não a única, proteína com expressão aumentada na gliose reativa, respondendo rapidamente a diversos tipos de dano ao SNC (Eddleston and Mucke, 1993).

Além das funções apresentadas em condições de saúde, os astrócitos estão envolvidos na etiologia de diversas doenças neurológicas como epilepsia (Reyes and Parpura, 2008; Seifert et al., 2010; Willoughby et al., 2003), doença de Alzheimer (Fuller et al., 2009; Kuchibhotla et al., 2009), consumo abusivo de etanol (Gonzalez and Salido, 2009) e outras drogas (Haydon et al., 2009), esquizofrenia (Halassa et al., 2007; Mitterauer, 2010), depressão (McNally et al., 2008) e desordens de humor (Lee et al., 2007), entre outras disfunções (De Keyser et al., 2008).

Levando-se em consideração a relevante participação dos astrócitos nas funções do SNC e seu envolvimento em muitas neuropatologias, torna-se importante estudar os mecanismos através dos quais o exercício físico exerce sua ação sobre os astrócitos, objetivando a busca de estratégias terapêuticas neuroprotetoras e preventivas.

2.4 Modelo experimental de inflamação no SNC induzida por administração sistêmica de LPS

O campo da neuroimunologia é um dos primeiros exemplos de sucesso no uso de uma variedade de modelos animais para identificar, comprovar e manipular as interações entre múltiplos sistemas orgânicos: neural, endócrino e imune. Enquanto estudos *in vitro* podem ser eficientemente utilizados para estudar as interações neuroimunes a nível celular, estudos animais são necessários para estudar os efeitos destas interações na expressão das doenças (Jafarian-Tehrani and Sternberg, 1999).

O cérebro é vulnerável à inflamação sistêmica, a qual leva à geração de citocinas circulantes, as quais impactam o SNC e causam inflamação. Sabe-se que a neuroinflamação está implicada em doenças como Doença de Alzheimer, autismo, Síndrome de Down, demência por HIV e doenças desmielinizantes (Akiyama et al., 2000; Fischer-Smith et al., 2004; McGeer and McGeer, 1998; Mhatre et al., 2004; Vargas et al., 2005).

Para mimetizar esta inflamação sistêmica que induz à neuroinflamação, pesquisadores têm utilizado o modelo de injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas capaz de

induzir neuroinflamação, apoptose hipocampal, prejuízo cognitivo, déficits de aprendizagem e geração de placas beta-amilóides no hipocampo (Lee et al., 2008; Shaw et al., 2001).

A administração central ou periférica de LPS leva a mudanças comportamentais nos animais, incluindo anorexia, febre, diminuição da motivação, redução do comportamento exploratório e sexual e diminuição da interação social (Dantzer, 2001; Kent et al., 1996). Coletivamente, estas mudanças comportamentais são denominadas "comportamento doentio" (*sickness behavior*), e coincidem com a expressão e liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células imunes (Kelley et al., 2003). Especificamente, é a ativação dos receptores Toll-like-4 (TLR-4) pelo LPS que induz a expressão destas citocinas, incluindo a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e TNF- α , primariamente a partir dos macrófagos na periferia (Buttini and Boddeke, 1995). Após sua produção, estas citocinas podem entrar no SNC pela via sanguínea (através dos órgãos circunventriculares e/ou via transporte ativo através da barreira hematoencefálica), ou elas são produzidas centralmente após a sinalização imune através de aferentes vagais na periferia ou através da ativação da microglia perivascular e astrócitos (Buttini and Boddeke, 1995; Konsman et al., 2000).

As células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE) também contêm receptores para LPS (Quan et al., 2003), então, é possível que o LPS possa ligar-se e entrar nestas células. Há estudos contraditórios sobre a capacidade do LPS de induzir a interrupção/aumento da permeabilidade da BHE (Chung et al., 2010). Alguns trabalhos mostraram que o LPS danifica a BHE e torna-a relativamente porosa (Gaillard et al., 2001; Gaillard et al., 2003; Xaio et al., 2001). Isto indica que talvez o LPS possa cruzar a BHE e entrar no SNC.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que tem sua regulação aumentada no SNC em resposta ao LPS. A microglia e os astrócitos são as principais origens do TNF- α . Estudos tem mostrado que a exposição ao TNF- α aumenta a permeabilidade das células endoteliais da microvasculatura cerebral (Mark and Miller, 1999; Ozaki et al., 1999) e que animais *knockout* para esta citocina tem a permeabilidade da BHE atenuada em modelo de doença de Parkinson (Zhao et al., 2007). O TNF- α regula muitos processos celulares, incluindo a inflamação, a diferenciação e a morte celular, através da ativação do receptor 1 de TNF (TNFR1) ou TNFR2 (Wajant et al., 2003). Evidências indicam a presença de níveis aumentados de TNF- α no cérebro e plasma de pacientes com Doença de Alzheimer (Fillit et al., 1991; Li et al., 2004).

O impacto do LPS sobre a aprendizagem e memória tem sido explorado através de diversas tarefas comportamentais que frequentemente produzem resultados complexos. A tarefa mais amplamente utilizada neste contexto é o Labirinto Aquático de Morris (LAM), uma tarefa de aprendizagem espacial dependente do hipocampo (Sparkman et al., 2005).

Pesquisas também tem relatado que a administração sistêmica de LPS reduz os níveis de BDNF e fator de crescimento do nervo (NGF) no hipocampo (Guan and Fang, 2006; Schnydrig et al., 2007), o que pode contribuir para o prejuízo na aprendizagem e memória. Recentes descobertas mostraram que a administração sistêmica de LPS afeta o comprimento dos dendritos e a densidade dos espinhos neuronais (Hochweller and Anderton, 2005), as células dopaminérgicas (Arai et al., 2004; Gao et al., 2003), a neurogênese (Guan and Fang, 2006), e a proliferação glial (Lee et al., 1993; Letournel-Boulland et al., 1994).

Poucos estudos têm focado sobre o efeito do LPS sobre a neurodegeneração e resposta imune no hipocampo (Chung et al., 2010). Um estudo recente mostrou que a administração intraperitoneal de LPS (1mg/kg de peso) efetivamente induziu a expressão do receptor de LPS (TLR4) no hipocampo de roedores e aumentou a ativação microglial e inflamação nos vasos sanguíneos, sem dano neuronal (Chung et al., 2010).

Como a microglia, os astrócitos também apresentam o TLR-4 (Carpentier et al., 2008). Pesquisas recentes mostraram que os astrócitos respondem ao LPS diminuindo a expressão de proteínas, tais como as proteínas das junções comunicantes (*gap junctions*) (Liao et al., 2010), e aumentando a expressão de outras como a GFAP e glutathione-S-transferase (Brahmachari et al., 2006; Vergara et al., 2010).

Então, a administração sistêmica de LPS parece ser um modelo adequado para estudo da neuroinflamação e consequente ativação dos astrócitos (Figura 3). Estratégias terapêuticas como o exercício físico podem ser relevantes para prevenção/supressão do processo inflamatório no SNC, no entanto, poucas pesquisas tem investigado esta possibilidade.

causam incapacidade, constituindo um importante desafio à reabilitação (Stiens et al., 1997).

Até metade do século XX, poucos indivíduos sobreviviam à lesão medular. Os avanços científicos e tecnológicos direcionados ao atendimento do trauma de medula, principalmente os cuidados imediatos após o acidente (na fase aguda da lesão), fizeram com que os profissionais da área da saúde desenvolvessem pesquisas e práticas que garantissem a sobrevivência das pessoas acometidas pelo trauma (Bampi et al., 2010). Na atualidade, a literatura aponta que os indivíduos com LM vivem em média de 30 a 40 anos após a lesão (Lin et al., 1997; McColl and Skinner, 1995). Assim, pesquisas envolvendo esta população também passaram a abordar as consequências da LM ao longo do tempo e a preocupar-se com a qualidade de vida destes indivíduos.

As mudanças no estilo de vida e as complicações relacionadas à LM podem levar o indivíduo a apresentar desajustes psicossociais como a depressão, que constitui uma complicação secundária prejudicial à qualidade de vida do indivíduo e da família (Duran et al., 2001). Comportamentos autodestrutivos, abuso de substâncias psicotrópicas e atitudes suicidas são frequentes. O suicídio é responsável por 4-21 % das mortes entre pessoas com LM (DeVivo et al., 1989).

Além da depressão reativa, a inatividade física é bastante frequente nesta população, o que pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças, principalmente as cardiovasculares (Bravo et al., 2004). A aterosclerose é frequentemente observada em pacientes com LM, associada com um baixo grau de inflamação crônica (Armstrong et al., 2006). A falta de atividade física e resistência à insulina podem aumentar os níveis de colesterol e TG sanguíneos e diminuir os níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL) (Midha et al., 1999). As doenças cardiovasculares têm sido mostradas ser a principal causa de morte em pacientes com LM (Yekutieli et al., 1989).

Estudos indicam que a LM *per se* é associada com à estado inflamatório crônico de baixo-grau e ativação endotelial, o que pode aumentar o risco aterogênico em pacientes com LM de longa-duração (Wang et al., 2007). Um estudo realizado com indivíduos com LM crônica (há mais de um ano), sem evidência clínica ou sorológica de infecção ativa, demonstrou que estes apresentam níveis de proteína C reativa (PCR), interleucina-6, endotelina-1 e VCAM-1 significativamente aumentados quando comparados com os indivíduos controle (Wang et al., 2007). Outros estudos mostraram que indivíduos com LM apresentam reduzida massa muscular e características de síndrome metabólica resistente à insulina (baixos níveis do colesterol HDL e

hiperinsulinemia) (Davies et al., 2002). Também tem sido mostrado que os níveis sorológicos de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-2 e TNF- α em indivíduos com LM crônica, livres de infecção, estão aumentados, indicando que há ativação crônica da imunoreatividade humoral (Hayes et al., 2002).

Pesquisas recentes revelaram que a lesão na medula espinhal pode ter impacto sobre sistemas moleculares importantes para a plasticidade sináptica no SNC (Fumagalli et al., 2009; Lau et al., 2011). Alguns estudos têm focado no período inicial da lesão medular investigando como estes eventos podem ter críticas implicações sobre a plasticidade de longa duração (Smith et al., 2011). Os resultados destes estudos estão começando a prover informações importantes sobre os mecanismos através dos quais a LM pode afetar as funções encefálicas além das consequências motoras, e podem prover novas pistas de como melhorar a recuperação funcional dos pacientes (Gomez-Pinilla et al., 2012). Em relação aos efeitos da lesão na ME sobre o hipocampo, um estudo mostrou que a LM reduziu os níveis de BDNF e marcadores de plasticidade relacionados no hipocampo (Gomez-Pinilla et al., 2012). Devido ao papel ativo do BDNF sobre a plasticidade sináptica, é possível que reduções no BDNF possam danificar a transmissão sináptica que é crucial para o funcionamento normal do hipocampo. Outro estudo relatou redução no RNA mensageiro do BDNF no hipocampo de ratos 24 horas após a LM ser induzida (Fumagalli et al., 2009). Baseado no papel do hipocampo no processamento de informações importantes para a aprendizagem, memória e emoções, os autores sugerem a possibilidade de que a LM aumente a vulnerabilidade emocional e desordens cognitivas. Esta possibilidade está de acordo com estudos clínicos mostrando que a LM reduz a qualidade de vida dos pacientes e frequentemente é associada com aumento da propensão para ansiedade e depressão (Anderson et al., 2009).

Sabe-se que indivíduos com depressão apresentam níveis sorológicos diminuídos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (Shimizu et al., 2003) e níveis aumentados da proteína S100B (Luo et al., 2010). Então, indivíduos com LM que apresentem depressão podem ter alteração nos níveis sorológicos destes fatores tróficos. Embora não tenham sido relatados estudos sobre os níveis sorológicos de BDNF em pessoas com LM crônica (Rojas Vega et al., 2008), um estudo investigou o efeito do exercício físico sobre os níveis sorológicos de BDNF, IGF-1, prolactina (marcador periférico para investigar alterações no sistema serotoninérgico cerebral) (Struder and Weicker, 2001), e cortisol em atletas com lesão medular. Os resultados mostraram que

os níveis de BDNF dos atletas com LM, ao repouso, foram mais altos comparado com indivíduos sem lesão medular, enquanto os níveis de prolactina e cortisol estavam dentro da taxa normal. Após 10 minutos de exercício, os atletas com LM demonstram aumento dos níveis de BDNF, porém, os níveis de prolactina (medida indireta da serotonina) e cortisol não diferiram do basal (Rojas Vega et al., 2008).

Alguns estudos têm relatado que pacientes depressivos apresentam aumento dos níveis de S100B no soro e líquido cefalorraquidiano (Rothermundt et al., 2001; Schroeter et al., 2008). Os níveis de S100B em fluidos biológicos apresentam-se elevados em condições caracterizadas por atividades mentais ou físicas estressantes, sugerindo que esta proteína pode ser fisiologicamente regulada e produzida durante condições de estresse (Marchi et al., 2004).

Desordens depressivas são o tipo mais comum de doença psicológica após a LM (Elliott and Frank, 1996; Fuhrer et al., 1993). A taxa de depressão em pessoas com LM varia de 11 a 37%, sendo mais alta que na população em geral (Craig et al., 1994). Além disso, estudos sugerem que indivíduos com LM são mais propensos a apresentar depressão com o aumento da idade e com o aumento do número de anos após a lesão (Krause et al., 2000). A sintomatologia depressiva após a LM tem sido atribuída a fatores como idade, dor, duração da hospitalização inicial, gênero, minoria étnica/racial, disponibilidade de suporte social, e uso ou não uso de estratégias de enfrentamento (Krause et al., 2000; Krause et al., 2009). A depressão está relacionada com aumento da frequência de complicações médicas, maior dependência nos cuidados-próprios e maior tempo gasto na cama (Elliott and Frank, 1996).

O comprometimento motor decorrente da LM associado à complicações frequentes como bexiga e intestino neurogênico, espasticidade, úlceras de pressão, deformidades osteoarticulares, trombose venosa profunda, ossificação heterotópica e síndromes dolorosas, podem levar o indivíduo com LM a apresentar comprometimento nas suas atividades de vida diária, traduzindo-se em prejuízo em sua independência funcional (Neves et al., 2007). A presença de sintomas depressivos também pode contribuir para este prejuízo.

Os fatores acima expostos podem comprometer seriamente a qualidade de vida do indivíduo portador de LM. Segundo a Organização Mundial da Saúde (1998), qualidade de vida é definida como a percepção do indivíduo a respeito da sua posição na vida, no contexto da cultura e do sistema de valores onde ele vive, e sua relação com seus objetivos, expectativas, padrões e conceitos. É um conceito amplo que incorpora a

saúde física, o estado psicológico, o nível de independência, o relacionamento social, as crenças pessoais e as relações do indivíduo com o ambiente em que ele vive.

Reconhecendo a importância da qualidade de vida do indivíduo com LM, têm-se buscado estratégias que interfiram positivamente na saúde física, psicológica, espiritual e social destes indivíduos.

2.5.1 Classificação neurológica da Lesão medular

A Escala de Classificação Neurológica da Lesão Medular (ASIA) permite aos profissionais da área de saúde classificar a lesão medular dentro de uma extensa variedade de tipos, auxiliando-os a determinar o prognóstico e o estado atual dos pacientes. Apresenta dois componentes (sensitivo e motor), além de elementos obrigatórios e medidas opcionais. Os elementos obrigatórios são usados para determinar o nível neurológico, gerando uma contagem específica de pontos que servem para caracterizar o funcionamento (sensitivo-motor) e o tipo de lesão (completa ou incompleta). As medidas opcionais, ainda que não sejam utilizadas na contagem, podem adicionar dados à descrição clínica do paciente (Maynard et al., 1997).

O Padrão Internacional para Classificação Neurológica da Lesão na Medula Espinhal (ISNCSCI) foi desenvolvido pela Associação Americana de Lesões da Medula Espinhal (*American Spinal Cord Injury Association Impairment, ASIA*) e endossado pela Sociedade Internacional de Medula Espinhal, e é uma classificação bem aceita em todo o mundo (Marino et al., 2003; Marino and Graves, 2004). O exame usa um leve toque dermatomal e a sensação da picada de uma agulha, além da avaliação da força motora de grupos musculares selecionados dos membros superiores e inferiores, para determinar o nível neurológico da lesão. A escala de comprometimento ASIA classifica a extensão da lesão medular de acordo com lesão motora completa (graus ASIA A e B) e lesão motora incompleta (ASIA C e D) (Buehner et al., 2012; Marino et al., 2003). O termo lesão medular completa é utilizado quando existe ausência da função motora e sensitiva a partir do segmento lesado (Maynard et al., 1997). As lesões medulares incompletas ocorrem quando houver alguma função sensitiva e/ou motora abaixo do nível neurológico. A zona de preservação parcial (ZPP) refere-se aos dermatomos e miótomos localizados abaixo do nível neurológico que se mantêm parcialmente inervados. O nível neurológico estabelecido pela ASIA refere-se ao segmento mais

inferior da medula com sensibilidade e função motora normais em ambos os lados do corpo (Maynard et al., 1997; Williams et al., 1997).

A escala da ASIA utiliza os achados do exame neurológico para classificar os tipos de lesão dentro de cinco categorias: A, B, C, D e E (Granger et al., 1993; Maynard et al., 1997; Waters et al., 1991; Williams et al., 1997), sendo: A = Lesão Completa. Não existe função motora e sensitiva nos segmentos medulares abaixo da lesão, incluindo os segmentos sacrais; B = Lesão Incompleta. Sensibilidade (total ou parcialmente) preservada com extensão através dos segmentos sacrais S4-S5, sem função motora abaixo do nível neurológico; C = Lesão Incompleta. Função motora preservada abaixo do nível da lesão com a maior parte dos músculos-chave abaixo do nível neurológico apresentando um grau de força muscular menor que 3; D = Lesão Incompleta. Função motora preservada abaixo do nível da lesão com a maior parte dos músculos-chave abaixo do nível neurológico apresentando um grau de força muscular maior ou igual a 3; E = Função Normal. Função motora e sensitiva normais (Behrman and Harkema, 2000).

2.6 Lesão medular e exercício físico

Nos últimos anos, vários estudos têm utilizado o exercício físico como uma intervenção terapêutica para melhorar aspectos relacionados ao bem-estar das pessoas com doenças crônicas e incapacitantes (Rimmer et al., 1996). O exercício físico tem mostrado efeitos positivos sobre dor, depressão e qualidade de vida de pessoas com osteoartrite (Ettinger et al., 1997), fibromiagia (Buckelew et al., 1998), HIV/AIDS (Lox et al., 1996) e lesão medular (Hicks et al., 2003). Em pessoas com LM, o nível de atividade física foi negativamente correlacionado com depressão (Santiago et al., 1993).

Pessoas ativas com paraplegia e tetraplegia apresentaram significativamente menos depressão e ansiedade e mais vigor que aquelas não praticantes de atividade física (Muraki et al., 2000). Outro estudo mostrou que pessoas com LM que se exercitaram duas vezes por semana, durante três meses, apresentaram menos dor, estresse, depressão e melhor conceito de si e qualidade de vida quando comparadas com indivíduos com LM que não se exercitavam (Ditor et al., 2003). O exercício físico parece ter potencial valor para melhora do bem-estar psicológico e da qualidade de vida de pessoas com LM (Asch et al., 1997).

Em relação às alterações metabólicas relacionadas à inatividade física dos indivíduos com LM, o exercício físico parece ter um importante papel na redução dos fatores de risco cardiovasculares nesta população (de Groot et al., 2003). Estudos com sujeitos com LM altamente treinados demonstraram que estes apresentam perfis lipídicos mais favoráveis que os sujeitos com LM inativos, indicando o importante papel da atividade física na promoção da saúde desta população (Aad et al., 2010).

Em relação às consequências encefálicas da lesão medular, especificamente hipocampais, que estão começando a ser discutidas na literatura, um estudo mostrou que a prática de exercício antes da LM previne a redução de BDNF hipocampal nos animais exercitados submetidos à LM. Neste estudo, o exercício mostrou importantes efeitos na contenção da redução hipocampal da sinapsina-I fosforilada, CaMKII e CREB que foi gerada pela LM (Gomez-Pinilla et al., 2012).

Outro aspecto importante a ser considerado é o efeito do exercício físico na promoção da independência funcional do indivíduo com LM (Hicks et al., 2003). Um estudo mostrou que um treinamento progressivo de exercício físico, realizado duas vezes por semana, durante nove meses, foi efetivo no aumento da força muscular e performance ergométrica dos membros superiores, refletindo na qualidade de vida e bem-estar psicológico dos indivíduos com LM (Applegate et al., 2003). Estes estudos demonstram que o exercício físico pode ser usado como uma modalidade terapêutica para melhora do bem-estar físico e psicológico de pessoas com LM, além de ter efeito profilático em termos de prevenção do declínio da qualidade de vida após a lesão medular.

2.7 Dança como estratégia terapêutica

A dança é um tipo de atividade física, voluntária e dependente da motivação, que pode promover a melhora da saúde física e mental. Tem sido utilizada como recurso terapêutico complementar em diversos casos como artrite, osteoporose, câncer e condições neurológicas (Aktas and Ogce, 2005; Hackney and Earhart, 2009; Hackney and Earhart, 2010b; Kudlacek et al., 1997; Moffet et al., 2000). Na população idosa, foi demonstrado que a dança pode significativamente melhorar a capacidade aeróbica, resistência muscular, força, flexibilidade, equilíbrio dinâmico e estático, agilidade e velocidade da marcha (Sackett, 1989). Um programa de 12 semanas de dança para indivíduos idosos resultou em significativa redução dos níveis de colesterol e TG,

consequentemente diminuindo o risco de doença cardiovascular (Kim et al., 2003). A realização de uma atividade física regular pode melhorar parâmetros metabólicos e o perfil lipídico em pessoas com deficiência, reduzindo a incidência de diabetes Mellitus e o risco de doenças cardiovasculares (Midha et al., 1999).

A dança pode promover bem-estar através do fortalecimento do sistema imune que é estimulado pela ação muscular e processos fisiológicos. Uma sessão de dança alivia a tensão, a fadiga crônica e outras condições prejudiciais que resultam do estresse (Hanna, 1995). A liberação de neurotransmissores como endorfinas criam um estado de bem-estar (Aktas and Ogce, 2005). Os efeitos benéficos do exercício físico regular são relacionados às mudanças no metabolismo monoaminérgico (Chaouloff, 1994; Chaouloff, 1997) e à liberação de fatores tróficos, dentre eles o BDNF (Berchtold et al., 2005; Cotman and Berchtold, 2002). É sabido que o BDNF contribui para a proteção dos neurônios motores contra a degeneração e promove brotamento axonal em lesões da medula espinhal (Jakeman et al., 1998). Em ratos, modelos de LM têm mostrado que a atividade neuromuscular aumenta os níveis de BDNF na região da medula espinhal (Gomez-Pinilla et al., 2004), desse modo mediando a plasticidade nesta região.

O movimento do corpo promovido pela dança estimula os sistemas circulatório, respiratório e muscular e ajuda no desenvolvimento da imagem corporal, melhorando a autoimagem e autoestima, reduzindo o estresse, a ansiedade de depressão. A dança também contribui para a diminuição da dor crônica e tensão corporal e aumenta as habilidades de comunicação. Ao nível mental, a dança proporciona melhora das habilidades cognitivas, motivação e memória (Aktas and Ogce, 2005). Esta atividade também tem efeito sobre a qualidade de vida (Belardinelli et al., 2008), como mostrado em uma pesquisa com indivíduos com Parkinson que apresentaram melhora na avaliação da qualidade de vida após um período de aulas de Tango (Hackney and Earhart, 2010a).

As aulas de dança geralmente ocorrem em grupo, o que estimula a interação social. O isolamento social é um forte contribuinte para o desenvolvimento de depressão e pode ocorrer como resultado de diversos fatores como limitação da mobilidade, doença e restrição econômica (Alpert et al., 2009). A ligação entre isolamento social e depressão é clara, assim como é clara a ligação entre interação social, melhora do humor e percepção da qualidade de vida (Anderson, 2001). A dança, sendo um programa regular de interação social, pode produzir melhora de sintomas depressivos e da qualidade de vida do praticante (Alpert et al., 2009).

Um dos aspectos importantes a ser salientado nas aulas de dança é a frequente presença da música. A associação da dança com a música envolve a coordenação do movimento com um ritmo externo, o qual pode ser bastante benéfico para algumas pessoas com distúrbios neurológicos (McGarry and Russo, 2011). Áreas cerebrais envolvidas na percepção da batida são conhecidas por se sobreporem a áreas cerebrais relacionadas à produção de movimento, tais como os gânglios basais e a área motora suplementar (Grahn and Brett, 2007). Além disso, a música é conhecida por despertar fortes emoções e pode ser utilizada como uma ferramenta de indução de emoções em uma sessão de dança (McGarry and Russo, 2011).

Diversas pesquisas têm mostrado que a música exerce efeito sobre o sistema imuno e endócrino e sobre o estado emocional (Hirokawa, 2004) e tem sido cada vez mais utilizada na área de neuroreabilitação (Aldridge et al., 2005). Atividades com música demonstram motivar a participação do cliente em programas de reabilitação física (Lee and Nantais, 1996).

Embora a dança para pessoas com lesão medular seja uma realidade no cenário mundial, tanto com o enfoque esportivo, quanto terapêutico e artístico, são raras as pesquisas de qualidade que investigam os efeitos da dança sobre esta população. Pesquisas nesta área são importantes para fundamentar a utilização da dança como recurso terapêutico complementar à Fisioterapia e Medicina.

CAPÍTULO II

Resultados

ARTIGO 1

Treadmill exercise induces hippocampal astroglial alterations in rats

Publicado na revista Neural Plasticity.

Research Article

Treadmill Exercise Induces Hippocampal Astroglial Alterations in Rats

Caren Bernardi,¹ Ana Carolina Tramontina,² Patrícia Nardin,² Regina Biasibetti,² Ana Paula Costa,² Adriana Fernanda Vizueti,² Cristiane Batassini,² Lucas Silva Tortorelli,² Krista Minéia Wartchow,² Márcio Ferreira Dutra,² Larissa Bobermin,² Patrícia Sesterheim,² André Quincozes-Santos,² Jaqueline de Souza,² and Carlos Alberto Gonçalves^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Carlos Alberto Gonçalves; casg@ufrgs.br

Received 3 September 2012; Revised 23 November 2012; Accepted 3 December 2012

Academic Editor: Michel Baudry

Copyright © 2013 Caren Bernardi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Physical exercise effects on brain health and cognitive performance have been described. Synaptic remodeling in hippocampus induced by physical exercise has been described in animal models, but the underlying mechanisms remain poorly understood. Changes in astrocytes, the glial cells involved in synaptic remodeling, need more characterization. We investigated the effect of moderate treadmill exercise (20 min/day) for 4 weeks on some parameters of astrocytic activity in rat hippocampal slices, namely, glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamate uptake and glutamine synthetase (GS) activities, glutathione content, and S100B protein content and secretion, as well as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels and glucose uptake activity in this tissue. Results show that moderate treadmill exercise was able to induce a decrease in GFAP content (evaluated by ELISA and immunohistochemistry) and an increase in GS activity. These changes could be mediated by corticosterone, whose levels were elevated in serum. BDNF, another putative mediator, was not altered in hippocampal tissue. Moreover, treadmill exercise caused a decrease in NO content. Our data indicate specific changes in astrocyte markers induced by physical exercise, the importance of studying astrocytes for understanding brain plasticity, as well as reinforce the relevance of physical exercise as a neuroprotective strategy.

1. Introduction

Studies have shown that physical exercise can have profound effects on cardiovascular, pulmonary, and the musculoskeletal system, as well as the central nervous system (CNS) [1, 2]. Moderate physical activity improves memory and learning [3–8] and is associated with a lower risk for Alzheimer's dementia [9], Parkinson's disease [10] and other types of neurodegenerative diseases [2]. One of the regions of CNS more affected by exercise is the hippocampus. A putative mechanism, through which the exercise exerts its effects on the hippocampus, is the induction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) [11].

Astrocytes, the most abundant glial cells, particularly those of the glutamatergic type, are very important elements

in neurotransmission [12, 13] and antioxidant defense, and this action involves the synthesis and secretion of glutathione (GSH) [14]. These cells are responsible for glutamate removal from the synaptic cleft and its conversion, through glutamine synthetase (GS) catalysis, into glutamine for replacement in the neurons. Moreover, increments in energy demand and functional activity during exercise may require functional and structural alterations in astrocytes [15, 16], due to their involvement in the blood brain barrier [17].

The involvement of astrocytes in brain plasticity is commonly related to changes in specific proteins, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), S100B, glutamate transporters and glutamine synthetase. With regard to BDNF, it is important to mention that this neurotrophin, which is

TABLE 1: Experimental sets of rats submitted to treadmill exercise.

Experimental set	N	Biochemical assays	Samples
1	11	Corticosterone	Blood
2	20	Immunohistochemistry for GFAP; ELISA for GFAP, S100B, and BDNF; GSH and NO measurement	Hippocampal tissue
3	17	Glutamate uptake and S100B secretion in slices	Hippocampal tissue

Adult Wistar rats were submitted to 4 weeks (20 min, 5 times a week) of treadmill exercise. At 2 h (set 1) or 24 h (sets 2 and 3) after the last exercise session, rats were anesthetized, killed, and samples were collected for the biochemical assays, as described in Section 2.

de novo synthesized in neurons, is released as mature BDNF and pro-BDNF, and that pro-BDNF is uptaken and released by astrocytes [18]. Therefore, recycling of BDNF by astrocytes seems to contribute to the regulation of synaptic plasticity [19].

Physical exercise induces biochemical alterations in astrocytes [20–23] and enhances the behavioral performance of animals in spatial memory tasks [7, 20, 24]. The contribution of astrocytes to the brain plasticity induced by physical exercise needs further characterization. This study aimed to investigate the effect of moderate exercise for 4 weeks on some parameters of astrocytic activity in the rat hippocampus.

2. Material and Methods

2.1. Animals. Forty-eight male Wistar rats (90 days old, weighing 250–320 g) were obtained from our breeding colony (at the Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul) and were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$) with free access to food and water. All animal experiments were carried out in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European parliament and following the regulations of the local animal house authorities. Rats were habituated with the treadmill apparatus to minimize novelty stress and submitted to maximal exercise test. After the test, rats that refused to run or who had the worst performance were assigned to the control/sedentary group (SED) ($N = 24$). The other animals were assigned to the exercise group (EXE) ($N = 24$). Three sets of experiments were carried out separately (Table 1).

2.2. Adaptation to Treadmill and Maximal Exercise Test. To perform the training, all animals were adapted to walk on a treadmill for three consecutive days (days 1 to 3). This adaptation consisted of walking on a treadmill for 10 min at 5 m/min. On the fourth day, animals were submitted to the maximal exercise test (MET). The MET was used to determine the maximal exercise capacity (MEC). The test consisted of a graded exercise on the treadmill, with speed increments of 5 m/min every 3 min, starting at 5 m/min and

continuing up to the MEC of each rat [25]. Values attained in the MET were used to plan the treadmill training program.

2.3. Treadmill Training. The exercise training consisted of running sessions on an adapted motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) at 60% of MEC (maximal velocity). Treadmill training was performed between 8:00 and 12:00 h. The animals ran for 20 minutes, 5 days a week, for 4 weeks. Selected animals that initially refused to run were encouraged by gently tapping their backs. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study. The control/sedentary group was transported to the experimental room and handled exactly as the experimental animals were and maintained in the turned off treadmill for 5 min without forcing them to run [26].

2.4. Serum Samples. Two hours after the last exercise session (20 min/day, 5 days/week during four weeks) animals ($n = 5-6$) were anesthetized with ketamine and xylazine (75 and 10 mg/kg, resp., i.p.), and then whole blood was obtained through an intracardiac puncture using a 0.37 mm diameter needle that was inserted into the intercostal space above the sternum. Serum was separated by centrifugation at $3000 \times g$ for 5 min. Serum samples were frozen (-20°C) until further analysis [27].

2.5. Hippocampal Tissue Samples. Twenty-four hours after the last exercise session (20 min/day, 5 days/week during four weeks) the animals were killed by decapitation, brains were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl_2 ; 1 MgSO_4 ; 25 HEPES; 1 KH_2PO_4 and 10 glucose, adjusted to pH 7.4, and previously aerated with O_2 . The hippocampi were dissected out, and transverse slices of 0.3 mm were obtained using a McIlwain Tissue Chopper. Slices were transferred immediately to 24-well culture plates, each well contains 0.3 mL of the solution described previously for measuring S100B secretion and 0.3 mL of HBSS (Hank's balanced salt solution) for measuring glutamate uptake and glucose uptake. Slice samples (hippocampus) were then frozen (-80°C) for biochemical measurements, described as follows.

2.6. Quantification of S100B and GFAP. S100B content in the hippocampus was measured by ELISA [28]. Briefly, 50 μL of sample plus 50 μL of tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.019 to 10 ng/mL. ELISA for GFAP [29] was carried out by coating the microtiter plate with 100 μL samples containing 30 μg of protein for overnight at 4°C . Incubation with a rabbit polyclonal anti-GFAP for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL.

2.7. Immunohistochemistry for GFAP. Rats were anesthetized using ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, resp., i.p.) and were perfused through the left cardiac ventricle with 200 mL of saline solution, followed by 200 mL of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4. After perfusion, the brains were removed, postfixed in the same fixative solution for 4 h at room temperature, and cryoprotected by immersion in 15% and 30% sucrose solution in PBS at 4°C. The brains were then frozen by immersion in isopentane cooled with CO₂ and stored in a freezer (-80°C) for later analyses [30]. Coronal slices (45 μm) were obtained at -20°C using a cryostat (Leitz). The free-floating sections were incubated with polyclonal anti-GFAP from rabbit, diluted 1:3000 in PBS-Triton X-100 0.4% and 2% bovine serum albumin (BSA), for 48 h at 4°C. After washing several times in PBS, tissue sections were incubated with anti-rabbit Alexa 488 (Molecular Probes) diluted 1:500 in PBS-TX 0.1% and 2% BSA for 1 h at room temperature. Afterwards, the sections were washed several times in PBS, mounted on slides with Fluor Save, and covered with coverslips. The images were obtained with a Confocal Olympus IX-81 microscope.

2.8. Glutamate Uptake Assay. Glutamate uptake was performed as previously described [31]. Briefly, hippocampal slices were transferred to 24-well plates and incubated for 23 min at 37°C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63 Na₂HPO₄·7H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃, and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4. The assay was started by the addition of 0.1 mM L-glutamate and 0.33 μCi/mL L-[2, 3-³H] glutamate. Incubation was stopped after 5 min by removal of the medium and rinsing the slices twice with ice-cold HBSS. The slices were then lysed in a solution containing 0.5 M NaOH. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Sodium-independent uptake was determined using N-methyl-D-glucamine instead of NaCl. Sodium-dependent glutamate uptake was obtained by subtracting the nonspecific uptake of the total uptake to obtain the specific uptake. Results (nmol/mg protein/min) were expressed as a percentage of the control.

2.9. Glutamine Synthetase (GS) Activity. The enzymatic assay was performed, as described previously [32]. Briefly, homogenized tissue samples were added to a reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂; 50 L-glutamate; 100 imidazole-HCl buffer (pH 7.4); 10 2-mercaptoethanol; 50 hydroxylamine-HCl; 10 ATP and incubated for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 mL of a solution containing: 370 mM ferric chloride; 670 mM HCl; 200 mM trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of γ-glutamylhydroxamate treated with ferric chloride reagent. Glutamine synthetase activity was expressed as μmol/mg prot/min.

2.10. Glutathione (GSH) Content Assay. GSH levels were measured as previously described [33]. This assay detects only

the reduced glutathione content. Briefly, homogenized slices were assayed in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0), and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with o-phthaldialdehyde (1 mg/mL methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wave lengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard glutathione solutions (0–500 μM). Glutathione concentrations were expressed as nmol/mg protein.

2.11. NO Assay. NO metabolites, NO₃⁻-(nitrate), and NO₂⁻-(nitrite) were determined according to [34]. Briefly, homogenates from hippocampal were mixed with 25% trichloroacetic and centrifuged at 1800 g for 10 min. The supernatant was immediately neutralized with 2 M potassium bicarbonate. NO₃⁻ was reduced to NO₂⁻ by nitrate reductase. The total NO₂⁻ in the incubation was measured by a colorimetric assay at 540 nm, based on the Griess reaction. A standard curve was performed using sodium nitrite (0–80 μM). Results were expressed as μM of nitrite/mg protein.

2.12. Evaluation of Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) Production. Intracellular ROS production was detected using the nonfluorescent cell permeating compound, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). Samples homogenized in sodium phosphate buffer, pH 7.4 with 140 mM KCl were treated with DCF-DA (10 μM) for 30 min at 37°C. The fluorescence was measured in a plate reader (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm, as described previously [35]. Values are obtained as a unit of fluorescence/mg protein and are expressed as percentage of control.

2.13. Glucose Uptake. Glucose uptake was performed in hippocampal slices. Briefly, slices were transferred to 24-well plates and incubated for 30 min at 37°C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63 Na₂HPO₄·7H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃, and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4. The assay was started by addition of 0.1 μCi/mL [2,3-³H]-D-glucose. The incubation was stopped after 30 min by removal of the medium and rinsing the slices twice with ice-cold HBSS. The slices were then lysed in a solution containing 0.5 M NaOH. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Nonspecific uptake was determined by using 25 μM cytochalasin B. Final glucose uptake was obtained by subtracting the nonspecific uptake of the total one to obtain the specific uptake.

2.14. Corticosterone Enzyme Immunoassay (EIA). Corticosterone concentrations in serum were measured using a commercial EIA kit conforming the manufacturer's protocol (Cayman Chemicals, MI, USA). Briefly, 50 μL aliquots were added to 96-well plates precoated with rabbit anti-sheep IgG antibody. We added corticosterone-specific acetylcholinesterase tracer and specific corticosterone antiserum

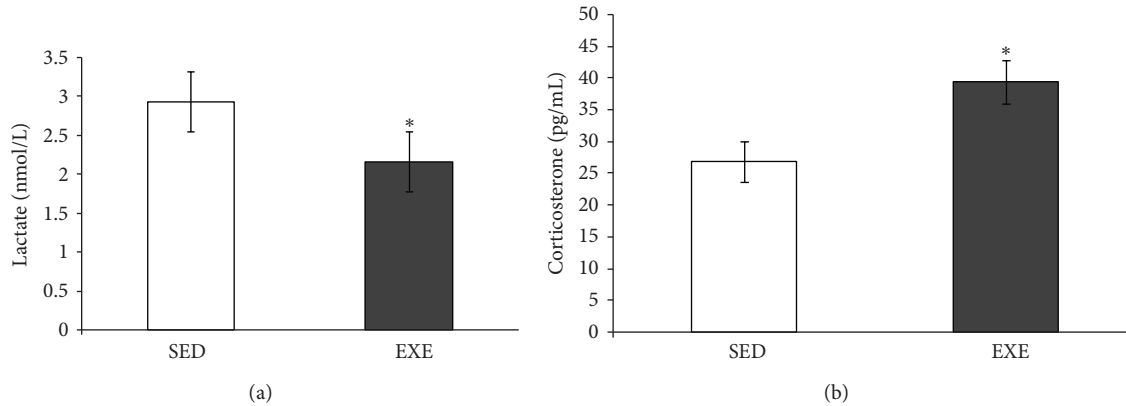


FIGURE 1: Moderate treadmill exercise increased serum corticosterone but decreased lactate levels. The blood lactate and serum corticosterone levels of rats submitted to 4 weeks (20 min/day, 5 days/week during four weeks) of treadmill exercise. The blood lactate level was measured with a lactate analyzer (a), and serum corticosterone was measured by ELISA (b). Values are mean \pm standard error of control/sedentary (SED) ($n = 5$) and exercise (EXE) group ($n = 6$). * means significantly different from other group (Student's t -test, $P < 0.05$).

and then placed plates on an orbital shaker for two hours. Plates were then developed and read at 412 nm. The concentration of corticosterone was calculated by comparing samples to the standard curve generated with the kit.

2.15. BDNF Concentration. BDNF protein was assessed using the ChemiKine brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Sandwich ELISA kit (Millipore, USA), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, the slices of hippocampus were individually homogenized in buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), containing 2% bovine serum albumin (BSA), 1 M NaCl, 4 mM EDTA·Na₂, 2% Triton X-100, 0.1% sodium azide, and the cocktail protease inhibitors (Sigma). Samples were centrifuged for 30 min at 14,000 \times g. The supernatant was incubated on a 96-well microplate previously coated with anti-BDNF monoclonal antibody. After blocking, plates were incubated with biotinylated mouse anti-BDNF monoclonal antibody for 2 h and streptavidin-HRP conjugate solution for 1 h. Then color reaction with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate was quantified in a plate reader at 450 nm. The standard BDNF curve ranged from 7.8 to 500 pg/mL.

2.16. Lactate Measurement. An increase in lactate level (reflecting an improved muscle metabolism) in the blood is commonly used as a marker of the effect of exercise training [36]. Blood samples were collected from a cut at the tip of the tail at the end of the last exercise bout. The lactate concentrations were determined with a lactate analyzer (Accutrend Plus, Roche Diagnostic, Germany).

2.17. Statistical Analysis. Parametric data from the experiments are presented as means \pm standard error and statistically evaluated by Student's t -test, assuming $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Exercise Protocol Characterization. In order to characterize whether the protocol for the treadmill exercise was

aerobic, we analyzed the blood lactate levels in animals [37]. The concentration of blood lactate in both groups, exercise (EXE) and control/sedentary (SED), remained below the anaerobic threshold of 7.17 ± 0.16 mM. Moreover, a significant decrease in blood lactate levels was observed in the exercise group, as compared to the control/sedentary group ($P = 0.04$) (Figure 1(a)). Serum corticosterone was used to evaluate stress responses induced by this exercise protocol. A small but significant increase was observed in serum corticosterone levels ($P = 0.04$, Figure 1(b)).

3.2. Hippocampal Contents of BDNF and GFAP. The BDNF content in hippocampus was not changed by this exercise protocol ($P = 0.17$, Figure 2(a)). However, the mean GFAP content was decreased in exercised rats ($P = 0.02$, Figure 2(b)). The immunohistochemistry of the *stratum radiatum* of CA1 hippocampal region (Figure 3(a) and 3(b)) suggests a decrease in GFAP immunoreactivity.

3.3. S100B Content and Secretion in Hippocampal Slices. No significant differences in S100B content, as evaluated by ELISA, were observed in the hippocampus of rats submitted to treadmill exercise ($P = 0.92$, Figure 4(a)). Hippocampal slice preparations from the two groups were used to evaluate *in vitro* S100B secretion. No significant changes in basal S100B secretion were found at 1 h (Figure 4(b)).

3.4. Glutamate Metabolic Parameters. This exercise protocol did not change the glutamate uptake ($P = 0.56$, Figure 5(a)) in hippocampal tissue. In contrast, we observed an increase in GS activity in exercised rats ($P = 0.003$, Figure 5(b)).

3.5. Hippocampal Redox Parameters. Two parameters were investigated to evaluate oxidative stress in the hippocampus: GSH (reduced form of glutathione) and NO (nitric oxide) contents. No significant differences were observed in GSH content ($P = 0.92$, Figure 6(a)). Conversely, a decrease in

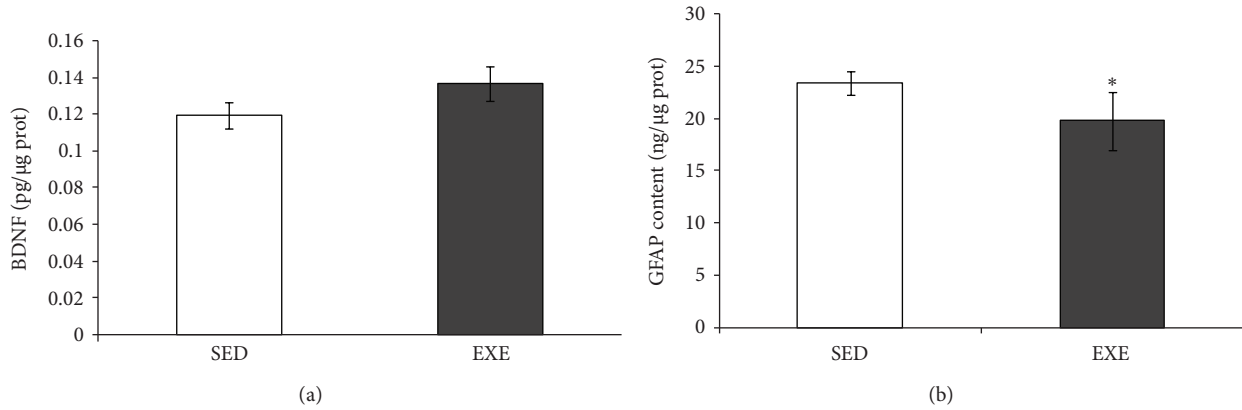


FIGURE 2: Moderate treadmill exercise decreased GFAP content in the hippocampus of exercised rats. Effects of treadmill exercise (20 min/day, 5 days/week during four weeks) on BDNF (a) and GFAP (b) contents in rat hippocampus were evaluated and were measured by ELISA. Values are mean \pm standard error of control/sedentary (SED) ($n = 6$) and exercise (EXE) group ($n = 7$). * means significantly different from respective control/sedentary group (Student's t -test, $P < 0.05$).

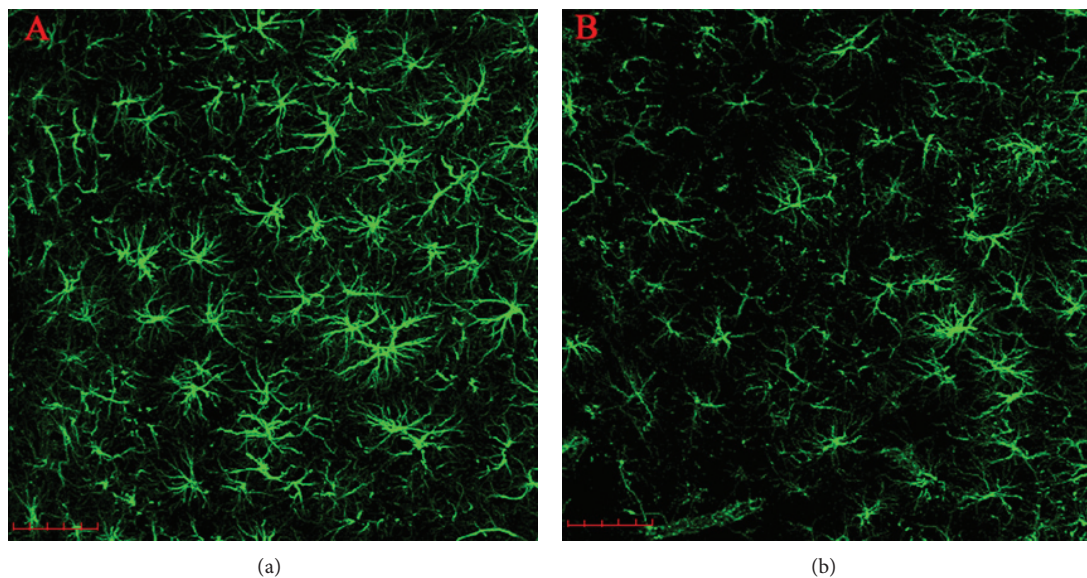


FIGURE 3: Immunohistochemistry for GFAP from rats submitted to treadmill exercise. Serial stack images obtained with an Olympus Confocal FV-1000 from GFAP immunofluorescence staining in the *stratum radiatum* of CA1 hippocampal region of rats submitted to treadmill exercise (20 min/day, 5 days/week during four weeks). The images showed an evident reduction in GFAP expression in control/sedentary (SED) rats (a) when compared to exercised (EXE) rats (b). Magnification of 40x, 1.0 μm of optical stack thickness, and 15 confocal planes. Scale bars = 50 μm .

NO content (based on nitrite measurement) was found in the hippocampal tissue of exercised rats ($P = 0.049$, Figure 6(b)).

4. Discussion

Physical exercise has unquestionable beneficial effects on brain health. However, relatively little is known about mechanisms underlying these benefits [2, 38]. Synaptic remodeling in hippocampus induced by physical exercise has been described in animal models (e.g., [39]). Astrocytes have been shown to play an important role in synaptic remodeling [40–42] and protecting the CNS against various pathologies [43]. The aim of this study was to evaluate the effect of

moderate treadmill running on astroglial parameters in the rat hippocampus.

Our results show that 4 weeks of moderate exercise decrease the GFAP content in the rat hippocampus. This is in agreement with a decrease in the number and immunoreactivity of GFAP cells in the rat cerebral cortex after running [22]. However, there are some controversies in the literature regarding the effect of physical exercise on GFAP expression in astrocytes. Some studies have shown that physical exercise seems to increase GFAP expression in different brain regions, such as the cerebral cortex, striatum [15], and hippocampus [20]. On the other hand, some studies have not found alterations in this parameter in the rat hippocampus [21, 23].

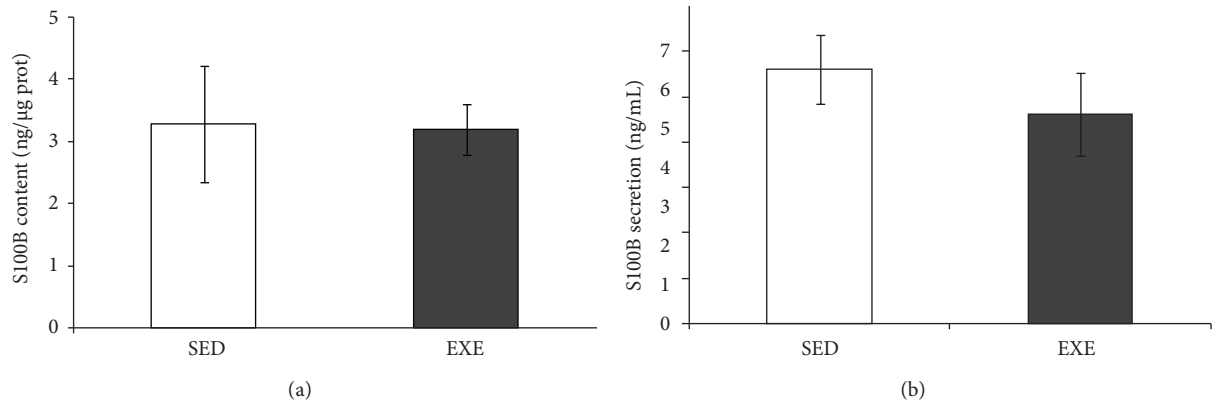


FIGURE 4: Hippocampal content and secretion of S100B were not affected by moderate treadmill training. S100B content and secretion in hippocampal slices of rats submitted to moderate treadmill exercise (20 min/day, 5 days/week during four weeks) were analyzed. Hippocampi were dissected out and chopped into 0.3 mm slices for measurement of total S100B content (a) and basal secretion in 1 h (b). S100B content was measured by ELISA. Values are mean \pm standard error of control/sedentary (SED) ($n = 6$) and exercised (EXE) ($n = 7$) rats.

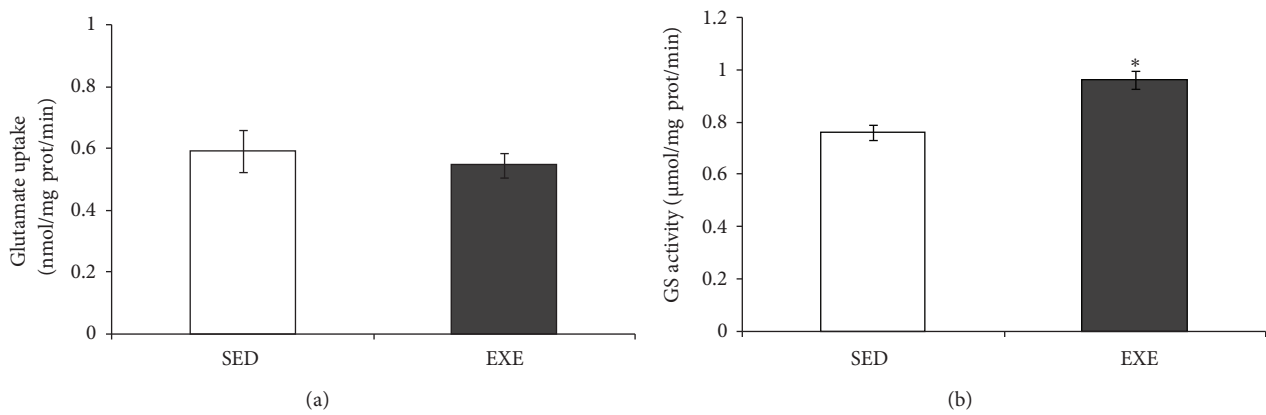


FIGURE 5: Moderate treadmill exercise increased glutamine synthetase activity in hippocampus of rats. Glutamate uptake and glutamine synthetase (GS) activity in the hippocampus of rats submitted to moderate treadmill exercise (20 min/day, 5 days/week during four weeks) were analyzed. Hippocampi were dissected out and chopped into 0.3 mm slices for measurement of glutamate uptake (a) or homogenized for measurement of GS activity (b). Values are mean \pm standard error of control/sedentary (SED) ($n = 8$) and exercise (EXE) ($n = 9$) group. *means significant differences from control (Student's t -test, $P < 0.05$).

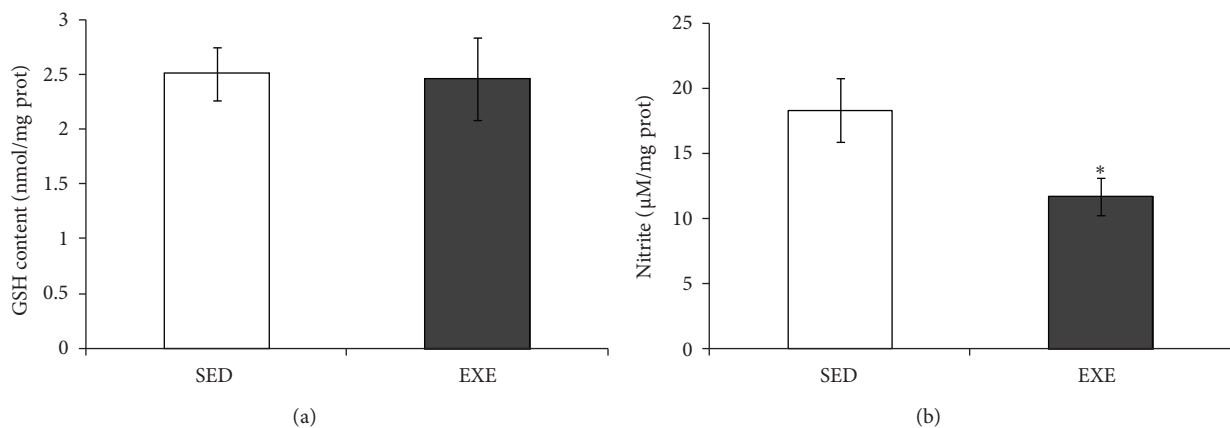


FIGURE 6: Moderate treadmill exercise decreased NO levels in hippocampus of rats. GSH (reduced form of glutathione) and NO content in the hippocampus of rats submitted to treadmill exercise (20 min/day, 5 days/week during four weeks) were analyzed. Twenty-four hours after the last session of exercise, hippocampi were dissected out and homogenized for measurement of GSH (a) or NO (b). Values are mean \pm standard error of control/sedentary (SED) ($n = 6$) and exercise (EXE) ($n = 7$) group. *means significantly different from respective control/sedentary group (Student's t -test, $P < 0.05$).

The discrepancy in results probably arises from methodological differences, including brain regions, exercise protocol (frequency, intensity), and duration of exercise training [44]. Moreover, we cannot rule out that the hippocampal changes observed (on GFAP and other parameters) reflect differences in rats, based on inherent differences; that is, rats that eagerly exercised versus rats that refused to run during the initial exercise test. However, blood lactate levels measured previously to this test were not altered (data not shown).

Lactate is an important energetic substrate for the brain, and it has been proposed that an increment of blood lactate, during physical activity, could induce brain changes [45]. Interestingly, we found a decrease in serum lactate with our protocol of physical activity. This apparent paradoxical decrease has also been described in mice submitted to 6 weeks of moderate-intensity treadmill exercise [46]. This decrease could be interpreted as an adaptation to exercise, in particular with an improvement of the Cori cycle (between the muscle and liver). In support of this idea, authors found an increase in lactate transporter in the liver, during this study. Therefore, it appears that lactate is not mediating the observed hippocampal changes. However, we cannot exclude an increment of blood lactate at the beginning of the exercise protocol, leading to hippocampal changes.

GFAP is a highly regulated protein, whose expression is induced by brain development and injury [47]. We observed a decrease in hippocampal GFAP, induced by physical exercise. At this moment, our work hypothesis is that corticosterone, which we found increased in our protocol of physical exercise, can downregulate GFAP expression. In fact, GFAP levels are negatively regulated by glucocorticoids in the rat hippocampus (see [48], for a review). Moreover, we can speculate that this downregulation of GFAP (induced by physical exercise) could be associated with other neuronal changes that accompany GFAP downregulated conditions, such as neurite outgrowth [49, 50]. Therefore, we may suggest that GFAP decreases as an indirect signal of neuronal plasticity in the rat hippocampus in response to treadmill exercise. It has been suggested that GFAP expression has an important role in astrocyte-neural interactions [51]; however, the consequence of this change in the cognitive process remains unclear. In contrast to GFAP, S100B was not changed by physical exercise in the rat hippocampus, confirming previous reports [21, 23]. This protein is secreted by astrocytes and has a trophic extracellular effect on neuron and glial cells [52, 53]. Moreover, no changes in basal *in vitro* secretion of this protein in the hippocampal slices were observed, in agreement with unaltered levels of cerebrospinal fluid S100B in rats submitted to treadmill exercise [20].

BDNF is a neurotrophin, associated with brain plasticity that is induced by physical exercise [2, 9, 54]. This neurotrophin had no effect on GFAP expression in the retina [55] but was able to reduce GFAP expression in the cerebral cortex after ischemia [56]. On the other hand, BDNF was able to restore hippocampal GFAP levels reduced by chronic unpredictable mild stress in rats [57]. Under these conditions, we did not observe any significant physical exercise-induced changes in BDNF that could be related to decreased GFAP levels. Corticosterone is able to transiently downregulate

BDNF mRNA in the hippocampus [58], possibly contributing, in this study, to maintain the levels of this neurotrophin unaltered. Moreover, other studies using moderate acute physical exercise (for 1 h) [59] (or for 2 weeks) [60, 61] did not find changes in hippocampal BDNF either.

In addition to the decrease in GFAP, we found an increment in GS activity. Whether this effect also depends on corticosterone remains unclear, but it has been reported that expression of GFAP and GS *in vivo* shows opposite responses to corticosterone in the hippocampus [62]. However, there is not enough information about changes in these proteins induced by physical exercise. Recently, we found that GS activity was increased by caloric restriction but not by physical exercise (treadmill running, 20 min sessions, for 12 weeks) [23]. This could suggest that the GS increment induced by the 4-week protocol of treadmill running could be transitory (as well as GFAP decrease). The increased GS activity induced by physical exercise could be beneficial in the brain; this enzyme is involved in the modulation of the turnover of glutamate through the glutamate-glutamine cycle and detoxification of ammonia, and its decrease has been observed in neurodegenerative disorders [63]. The enzyme activity is negatively modulated by nitration on the tyrosine residue, through a NMDA receptor-mediated cGMP-NO signal transduction pathway (see Butterworth [64] for a review).

Note that while NO works as a physiological mediator, excessive NO release due to the high expression of inducible NO synthase (iNOS) mediates inflammatory/degenerative brain diseases [65]. Herein, we observed a decrease in NO content (measured by nitrite content), which in turn could be connected to the increased GS activity. In agreement with these findings, physical exercise was able to prevent the increase in hippocampal NO induced by intracerebroventricular streptozotocin administration [20]. The mechanism for this is unclear, but it may also be mediated by corticosterone. In support of this hypothesis, swimming exercise induced a decrease in the rat hippocampal iNOS, possibly dependent on corticosterone [66]. Other experimental evidence reinforces the importance of treadmill exercise for decreasing iNOS in murine models of neurodegenerative diseases, such as Parkinson's [67] and Alzheimer's diseases [68].

Considering the close metabolic relationship between glutamine and glutamate, we also investigated glutamate uptake in hippocampal slices of exercised rats. No changes in glutamate uptake were observed, in agreement with our previous study using a longer protocol of physical exercise [23]. Hippocampal GSH content and ROS (data not shown) were not altered by physical exercise under our conditions. A glutathione decrease could suggest oxidative stress, and an increment induced by physical exercise has been interpreted as signal of improvement in antioxidant defense [20, 23]. An elegant study has shown that moderate treadmill running did not change the basal content of glutathione, but it was able to reverse the decrease in glutathione induced by intraperitoneal buthionine-sulfoximine administration [69]. Another important aspect for brain activity, during physical exercise, is the increment cerebral blood flow that is commonly related to energetic substrate uptake [70]. For example, diabetic type

2 patients may benefit from physical exercise, as muscles dramatically increase glucose uptake [71]. However, brain alterations induced by physical alterations have not been evaluated, and potential changes in the hypometabolism that precedes neurodegenerative diseases (see Cunneane, et al. [72]) could be very useful to improve life quality. Herein, no changes were observed in the glucose uptake of hippocampal slices of healthy exercised animals (data not shown). However, this parameter should be investigated in brain disease models, where physical exercise has been proposed as a neuroprotective strategy (e.g., Rodrigues et al. [20]).

5. Conclusions

Our data show that moderate treadmill exercise was able to induce a decrease in GFAP content (evaluated by ELISA and immunohistochemistry) and to increase GS activity. These changes could be mediated by corticosterone, whose levels were elevated in serum. BDNF, another putative regulator of the expression of these astroglial proteins, was not altered in hippocampal tissue. Moreover, treadmill exercise caused a decrease in NO content. We did not observe changes in other astroglial parameters such as glutamate uptake, GSH content, and S100B protein. Taken together, these data indicate specific changes in astrocyte markers induced by physical exercise, the importance of astrocytes in brain plasticity, as well as reinforce the relevance of physical exercise as a strategy for neuroprotection.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/Rede IBN 01.06.0842-00, and National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection (INCTEN).

References

- [1] H. van Praag, "Exercise and the brain: something to chew on," *Trends in Neurosciences*, vol. 32, no. 5, pp. 283–290, 2009.
- [2] Q. Ma, "Beneficial effects of moderate voluntary physical exercise and its biological mechanisms on brain health," *Neuroscience Bulletin*, vol. 24, no. 4, pp. 265–270, 2008.
- [3] H. van Praag, B. R. Christie, T. J. Sejnowski, and F. H. Gage, "Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 23, pp. 13427–13431, 1999.
- [4] M. K. Jedrzejewski, V. M. Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, "Physical activity and cognitive health," *Alzheimer's and Dementia*, vol. 3, no. 2, pp. 98–108, 2007.
- [5] Z. Radák, T. Kaneko, S. Tahara et al., "Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain," *Neurochemistry International*, vol. 38, no. 1, pp. 17–23, 2001.
- [6] H. Ogonovszky, I. Berkes, S. Kumagai et al., "The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain," *Neurochemistry International*, vol. 46, no. 8, pp. 635–640, 2005.
- [7] E. T. Ang, G. S. Dawe, P. T. H. Wong, S. Moochhala, and Y. K. Ng, "Alterations in spatial learning and memory after forced exercise," *Brain Research*, vol. 1113, no. 1, pp. 186–193, 2006.
- [8] L. Grace, S. Heschem, L. A. Kellaway, K. Bugarith, and V. A. Russell, "Effect of exercise on learning and memory in a rat model of developmental stress," *Metabolic Brain Disease*, vol. 24, no. 4, pp. 643–657, 2009.
- [9] C. W. Cotman and N. C. Berchtold, "Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity," *Trends in Neurosciences*, vol. 25, no. 6, pp. 295–301, 2002.
- [10] A. D. Smith and M. J. Zigmond, "Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism," *Experimental Neurology*, vol. 184, no. 1, pp. 31–39, 2003.
- [11] J. A. Zoladz and A. Pilc, "The effect of physical activity on the brain derived neurotrophic factor: from animal to human studies," *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 61, no. 5, pp. 533–541, 2010.
- [12] V. Parpura and R. Zorec, "Gliotransmission: exocytotic release from astrocytes," *Brain Research Reviews*, vol. 63, no. 1-2, pp. 83–92, 2010.
- [13] G. Perea and A. Araque, "GLIA modulates synaptic transmission," *Brain Research Reviews*, vol. 63, no. 1-2, pp. 93–102, 2010.
- [14] R. Dringen, "Metabolism and functions of glutathione in brain," *Progress in Neurobiology*, vol. 62, no. 6, pp. 649–671, 2000.
- [15] J. Li, Y. H. Ding, J. A. Rafols, Q. Lai, J. P. McAllister II, and Y. Ding, "Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise," *Neuroscience Letters*, vol. 386, no. 3, pp. 160–164, 2005.
- [16] M. E. Gibbs, D. Hutchinson, and L. Hertz, "Astrocytic involvement in learning and memory consolidation," *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, vol. 32, no. 5, pp. 927–944, 2008.
- [17] J. Correale and A. Villa, "Cellular elements of the blood-brain barrier," *Neurochemical Research*, vol. 34, no. 12, pp. 2067–2077, 2009.
- [18] M. Bergami, S. Santi, E. Formaggio et al., "Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes," *Journal of Cell Biology*, vol. 183, no. 2, pp. 213–221, 2008.
- [19] P. G. Haydon and G. Carmignoto, "Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling," *Physiological Reviews*, vol. 86, no. 3, pp. 1009–1031, 2006.
- [20] L. Rodrigues, M. F. Dutra, J. Ilha et al., "Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin," *Journal of Neural Transmission*, vol. 117, no. 11, pp. 1295–1305, 2010.
- [21] P. N. de Senna, J. Ilha, P. P. A. Baptista et al., "Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats," *Metabolic Brain Disease*, vol. 26, no. 4, pp. 269–279, 2011.
- [22] E. T. Ang, P. T. H. Wong, S. Moochhala, and Y. K. Ng, "Cytokine changes in the horizontal diagonal band of Broca in the septum after running and stroke: a correlation to glial activation," *Neuroscience*, vol. 129, no. 2, pp. 337–347, 2004.

- [23] K. Santin, R. F. da Rocha, F. Cechetti et al., "Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus," *Brain Research*, vol. 1421, pp. 1–10, 2011.
- [24] P. R. Burghardt, L. J. Fulk, G. A. Hand, and M. A. Wilson, "The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats," *Brain Research*, vol. 1019, no. 1-2, pp. 84–96, 2004.
- [25] R. M. Melo, E. Martinho Jr., and L. C. Michelini, "Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles," *Hypertension*, vol. 42, no. 4, pp. 851–857, 2003.
- [26] D. Scopel, C. Fochesatto, H. Cimarosti et al., "Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation," *Brain Research Bulletin*, vol. 71, no. 1-3, pp. 155–159, 2006.
- [27] C. B. O. Netto, S. Conte, M. C. Leite et al., "Serum S100B protein is increased in fasting rats," *Archives of Medical Research*, vol. 37, no. 5, pp. 683–686, 2006.
- [28] M. C. Leite, F. Galland, G. Brolese et al., "A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: methodological features of the measurement of this glial protein," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 169, no. 1, pp. 93–99, 2008.
- [29] F. Tramontina, M. C. Leite, K. Cereser et al., "Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 162, no. 1-2, pp. 282–286, 2007.
- [30] A. Swarowsky, L. Rodrigues, R. Biasibetti et al., "Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis," *Behavioural Brain Research*, vol. 190, no. 2, pp. 206–211, 2008.
- [31] A. P. Thomazi, G. F. Godinho, J. M. Rodrigues et al., "Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine," *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 125, no. 7, pp. 475–481, 2004.
- [32] A. M. Feoli, I. Siqueira, L. M. V. Almeida et al., "Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition," *Journal of Nutrition*, vol. 136, no. 9, pp. 2357–2361, 2006.
- [33] R. W. Browne and D. Armstrong, "Reduced glutathione and glutathione disulfide," *Methods in Molecular Biology*, vol. 108, pp. 347–352, 1998.
- [34] J. M. Hevel and M. A. Marletta, "Nitric-oxide synthase assays," *Methods in Enzymology*, vol. 233, pp. 250–258, 1994.
- [35] A. Quincozes-Santos, P. Nardin, D. F. Souza et al., "The janus face of resveratrol in astroglial cells," *Neurotoxicity Research*, vol. 16, no. 1, pp. 30–41, 2009.
- [36] L. P. Garetto, E. A. Richter, M. N. Goodman, and N. B. Ruderman, "Enhanced muscle glucose metabolism after exercise in the rat: the two phases," *The American Journal of Physiology*, vol. 246, no. 6, pp. E471–475, 1984.
- [37] F. A. Voltarelli, C. A. Gobatto, and M. A. de Mello, "Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 35, no. 11, pp. 1389–1394, 2002.
- [38] E. T. Ang and F. Gomez-Pinilla, "Potential therapeutic effects of exercise to the brain," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 24, pp. 2564–2571, 2007.
- [39] A. T. U. Schaefer, K. Grafen, G. Teuchert-Noodt, and Y. Winter, "Synaptic remodeling in the dentate gyrus, CA3, CA1, subiculum, and entorhinal cortex of mice: effects of deprived rearing and voluntary running," *Neural Plasticity*, vol. 2010, Article ID 870573, 11 pages, 2010.
- [40] M. Haber, L. Zhou, and K. K. Murai, "Cooperative astrocyte and dendritic spine dynamics at hippocampal excitatory synapses," *Journal of Neuroscience*, vol. 26, no. 35, pp. 8881–8891, 2006.
- [41] E. C. Beattie, D. Stellwagen, W. Morishita et al., "Control of synaptic strength by glial TNF α ," *Science*, vol. 295, no. 5563, pp. 2282–2285, 2002.
- [42] A. Panatier, D. T. Theodosis, J. P. Mothet et al., "Glial-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory," *Cell*, vol. 125, no. 4, pp. 775–784, 2006.
- [43] J. Middeldorp and E. M. Hol, "GFAP in health and disease," *Progress in Neurobiology*, vol. 93, no. 3, pp. 421–443, 2011.
- [44] C. W. Cotman, N. C. Berchtold, and L. A. Christie, "Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation," *Trends in Neurosciences*, vol. 30, no. 9, pp. 464–472, 2007.
- [45] G. van Hall, M. Strömstad, P. Rasmussen et al., "Blood lactate is an important energy source for the human brain," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 29, no. 6, pp. 1121–1129, 2009.
- [46] E. Lezi, J. Lu, J. M. Burns, and R. H. Swerdlow, "Effect of exercise on mouse liver and brain bioenergetic infrastructures," *Experimental Physiology*, vol. 98, pp. 207–219, 2013.
- [47] L. F. Eng, R. S. Ghirnikar, and Y. L. Lee, "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000)," *Neurochemical Research*, vol. 25, no. 9-10, pp. 1439–1451, 2000.
- [48] N. R. Nichols, D. Agolley, M. Zieba, and N. Bye, "Glucocorticoid regulation of glial responses during hippocampal neurodegeneration and regeneration," *Brain Research Reviews*, vol. 48, no. 2, pp. 287–301, 2005.
- [49] I. Rozovsky, M. Wei, D. J. Stone et al., "Estradiol (E2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin," *Endocrinology*, vol. 143, no. 2, pp. 636–646, 2002.
- [50] V. Menet, M. Giménez Y Ribotta, N. Chauvet et al., "Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression," *Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 16, pp. 6147–6158, 2001.
- [51] H. Tanaka, A. Katoh, K. Oguro et al., "Disturbance of hippocampal long-term potentiation after transient ischemia in GFAP deficient mice," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 67, no. 1, pp. 11–20, 2002.
- [52] C. A. Gonçalves, M. C. Leite, and P. Nardin, "Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury," *Clinical Biochemistry*, vol. 41, no. 10-11, pp. 755–763, 2008.
- [53] R. Donato and C. W. Heizmann, "S100B protein in the nervous system and cardiovascular apparatus in normal and pathological conditions," *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, vol. 2010, Article ID 929712, 2 pages, 2010.
- [54] P. Rasmussen, P. Brassard, H. Adser et al., "Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise," *Experimental Physiology*, vol. 94, no. 10, pp. 1062–1069, 2009.
- [55] H. Chen and A. J. Weber, "Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Müller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor," *GLIA*, vol. 38, no. 2, pp. 115–125, 2002.
- [56] W. R. Schäbitz, C. Berger, R. Kollmar et al., "Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia," *Stroke*, vol. 35, no. 4, pp. 992–997, 2004.

- [57] Y. Ye, G. Wang, H. Wang, and X. Wang, "Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression," *Neuroscience Letters*, vol. 503, no. 1, pp. 15–19, 2011.
- [58] H. Soya, T. Nakamura, C. C. Deocaris et al., "BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 358, no. 4, pp. 961–967, 2007.
- [59] M. Goekint, B. Roelands, E. Heyman, R. Njemini, and R. Meeusen, "Influence of citalopram and environmental temperature on exercise-induced changes in BDNF," *Neuroscience Letters*, vol. 494, no. 2, pp. 150–154, 2011.
- [60] F. Cechetti, C. Fochesatto, D. Scopel et al., "Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus," *Brain Research*, vol. 1188, no. 1, pp. 182–188, 2008.
- [61] A. F. B. Ferreira, C. C. Real, A. C. Rodrigues, A. S. Alves, and L. R. G. Britto, "Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, BDNF-independent hippocampal plasticity," *Brain Research*, vol. 1425, pp. 111–122, 2011.
- [62] N. J. Laping, N. R. Nichols, J. R. Day, S. A. Johnson, and C. E. Finch, "Transcriptional control of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in vivo shows opposite responses to corticosterone in the hippocampus," *Endocrinology*, vol. 135, no. 5, pp. 1928–1933, 1994.
- [63] S. R. Robinson, "Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 66, no. 5, pp. 972–980, 2001.
- [64] R. F. Butterworth, "Altered glial-neuronal crosstalk: cornerstone in the pathogenesis of hepatic encephalopathy," *Neurochemistry International*, vol. 57, no. 4, pp. 383–388, 2010.
- [65] G. C. Brown, "Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: INOS and NADPH oxidase," *Biochemical Society Transactions*, vol. 35, no. 5, pp. 1119–1121, 2007.
- [66] X. Liu, J. Yang le, S. J. Fan, H. Jiang, and F. Pan, "Swimming exercise effects on the expression of HSP70 and iNOS in hippocampus and prefrontal cortex in combined stress," *Neuroscience Letters*, vol. 476, no. 2, pp. 99–103, 2010.
- [67] Y.-H. Sung, S.-C. Kim, H.-P. Hong et al., "Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice," *Life Sciences*, vol. 91, no. 25–26, pp. 1309–1316, 2012.
- [68] Y. H. Leem, Y. I. Lee, H. J. Son, and S. H. Lee, "Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 406, no. 3, pp. 359–365, 2011.
- [69] S. Salim, N. Sarraj, M. Taneja, K. Saha, M. V. Tejada-Simon, and G. Chugh, "Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats," *Behavioural Brain Research*, vol. 208, no. 2, pp. 545–552, 2010.
- [70] J. S. Querido and A. W. Sheel, "Regulation of cerebral blood flow during exercise," *Sports Medicine*, vol. 37, no. 9, pp. 765–782, 2007.
- [71] M. L. Goodwin, "Blood glucose regulation during prolonged, submaximal, continuous exercise: a guide for clinicians," *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 4, no. 3, pp. 694–705, 2010.
- [72] S. Cunnane, S. Nugent, M. Roy et al., "Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease," *Nutrition*, vol. 27, no. 1, pp. 3–20, 2011.

ARTIGO 2

Hippocampal astroglial alterations in rats after wheel running

Será submetido à publicação.

HIPPOCAMPAL ASTROGLIAL ALTERATIONS IN RATS AFTER WHEEL RUNNING

Caren Bernardi¹, Ana Carolina Tramontina², Patrícia Nardin², Regina Biasibetti²,
Adriana Fernanda Vizueti², Krista Minéia Wartchow², Ana Paula Costa², André
Quincozes-Santos², Carlos Alberto Gonçalves²

¹ Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90046-900 Porto Alegre, RS, Brazil

² Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author: Carlos Alberto Gonçalves

Departamento Bioquímica, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600 - anexo

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-003

Fax: 55-51-3308 5535

E-mail: casg@ufrgs.br

ABSTRACT

Although the favorable effects of physical exercise in brain health and neurorehabilitation are well known, detailed cellular alterations and mechanisms of action of exercise on the brain have been limited. Changes in astrocytes, the glial cells involved in synaptic plasticity, cerebral metabolism and antioxidant defense of SNC, need more characterization. We investigated the effect of wheel running (12 hours/night) for 4 weeks on some parameters of astrocytic activity in rat hippocampal slices, namely glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamate uptake and glutamine synthetase (GS) activities, glutathione content, and S100B protein content, as well as neurotrophic brain-derived factor (BDNF) levels and glucose uptake activity in this tissue. Results show that wheel running was able to induce increase of GS activity in hippocampus. These changes could be mediated by BDNF, whose levels were elevated in hippocampal tissue. Our data indicate that astrocytes are involved in the mechanisms by which voluntary exercise promotes its effects on brain plasticity and reinforces the relevance of to study the astrocytes when searching to effective treatment strategies for brain diseases.

Key words: wheel running, astrocyte, glutamine synthetase, BDNF, brain plasticity.

1. Introduction

Although the favorable effects of physical exercise in brain health and neurorehabilitation are well known, detailed cellular alterations and mechanisms of action of exercise on the brain have been limited. The physical exercise promotes beneficial effects on cerebral plasticity, angiogenesis, neurogenesis and cognitive functions (van Praag et al., 1999a, van Praag et al., 1999b, Cotman and Berchtold, 2002, van Praag et al., 2005). These effects on SNC have been demonstrated in animal studies (van Praag et al., 1999a). There are two experimental protocols for to study the exercise effects on brain: (1) voluntary exercise that allowing free access to a running wheel; and (2) forced exercise that exposing animal to forced running on a treadmill conforming experimenter demand. There are many studies that demonstrated different effects promoted by treadmill running and voluntary exercise on brain (Hayes et al., 2008,

Pietropaolo et al., 2008). These studies suggest that both types of exercise do not correlate and presenting different mechanisms of action on the brain.

The astrocytes are the main glial cell type in the brain involved in plasticity mechanisms and maintaining CNS homeostasis (Araque and Navarrete, 2010). These cells play a key role in the brain physiology and diverse neurodegenerative diseases, and have become a target for possible therapeutic strategies. Previous study of our group have been investigated the effect of treadmill running on astrocytes in normal and pathologic situations (Rodrigues et al., 2010, Santin et al., 2011, Bernardi et al., 2013). The activity and protein markers of astrocytes have been evaluated in forced exercise however there are few studies analyzing these parameters using voluntary exercise. The most studied astroglial parameters are S100B and GFAP protein. S100B is a calcium-binding protein found in brain tissue, predominantly in the astrocytes (Nardin et al., 2009). This protein has a trophic role in neuronal and glial cells and it is involved in the regulation of a variety of cellular mechanisms such as proliferation, differentiation and energy metabolism (Goncalves et al., 2008). The glial fibrillary acidic protein (GFAP) is a member of the cytoskeletal protein family constituting the principal intermediate filament in mature astrocytes of the CNS and it is a specific astrocytic marker (Eng et al., 2000). Astrocytes are responsible for uptake of glutamate of the extracellular space; the glutamine synthetase enzyme, present in astrocytes, converts the glutamate that was uptake in glutamine which will be utilized by neurons for recycling the neurotransmitters (Hertz et al., 1999). Among this, astrocytes have a important role in the cerebral metabolism through your participation in the blood-brain-barrier (Correale and Villa, 2009) and glucose uptake activity (Madsen et al., 1995). These cells are important to antioxidant defense of CNS due production of glutathione (Dringen, 2000), the main antioxidant of brain. The astrocytes also participate of production of the BDNF in the brain via uptake de pro-BDNF in the extracellular space and supply pro-BDNF for neurons (Bergami et al., 2008). The aim of this study was to evaluate the effect of 4 weeks wheel running on the activity and proteins markers of astrocytes, and BDNF expression in the hippocampus of Wistar rats.

2. Material and methods

Animals. Twenty-four male Wistar rats (90 days old, weighing 250–320 g) were obtained from our breeding colony (at the Department of Biochemistry, Federal

University of Rio Grande do Sul) and were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of 22 ± 1 C) with free access to food and water. All animal experiments were carried out in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European parliament and following the regulations of the local animal house authorities.

Wheel-running protocol. Rats were habituated with the wheel running apparatus to minimize novelty stress during 4 days. The animals were randomly assigned to the sedentary/control group (SED; n=12) and exercise group (EXE; n=12). The exercise rats were singly placed in cages equipped with running wheels during the dark cycle, 5 times a week, for 4 weeks. The average distance run was 3,83km at average velocity of 3,06 Km/h. Sedentary rats were singly placed in cages standard during the dark cycle.

Hippocampal tissues collection. Twenty-four hours after the last exercise session the animals were killed by decapitation, brains were removed and the hippocampi were dissected out. Transverse slices of 0.3 mm were obtained using a McIlwain Tissue Chopper. Slices were transferred immediately to 24-well culture plates, each well contains 0.3 mL of HBSS (Hank's balanced salt solution) for measuring glutamate uptake and glucose uptake. Slice samples (hippocampus) were then frozen (-80 C) for biochemical measurements.

Quantification of S100B and GFAP. S100B content in the hippocampus was measured by ELISA (Leite et al., 2008). Briefly, 50 μ L of sample plus 50 μ L of tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.019 to 10 ng/mL. ELISA for GFAP (Tramontina et al., 2007) was carried out by coating the microtiter plate with 100 μ L samples containing 30 μ g of protein for overnight at 4C. Incubation with a rabbit polyclonal anti-GFAP for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL.

Glutamate uptake Assay. Glutamate uptake was performed as previously described (Thomazi et al., 2004). Briefly, hippocampal slices were transferred to 24-well plates and incubated for 23 min at 37°C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63

Na₂HPO₄·7H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃, and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4. The assay was started by the addition of 0.1 mM L-glutamate and 0.33 μCi/mL L-[2, 3-³H] glutamate. Incubation was stopped after 5 min by removal of the medium and rinsing the slices twice with ice-cold HBSS. The slices were then lysed in a solution containing 0.5 M NaOH. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Sodium-independent uptake was determined using N-methyl-D-glucamine instead of NaCl. Sodium-dependent glutamate uptake was obtained by subtracting the nonspecific uptake of the total uptake to obtain the specific uptake.

Glutamine synthetase activity. The glutamine synthetase activity was analyzed by enzymatic assay, as described previously (Feoli et al., 2006). Briefly, homogenized tissue samples were added to a reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂; 50 L-glutamate; 100 imidazole-HCl buffer (pH 7.4); 10 2-mercaptoethanol; 50 hydroxylamine-HCl; 10 ATP and incubated for 15 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 mL of a solution containing: 370 mM ferric chloride; 670 mM HCl; 200 mM trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities of α-glutamylhydroxamate treated with ferric chloride reagent. GS activity was expressed as μmol/mgprot/min.

Glutathione content assay. GSH levels were measured as previously described (Browne and Armstrong, 1998). This assay detects only the reduced glutathione content. Briefly, homogenized slices were assayed in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0), and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with o-phthaldialdehyde (1 mg/mL methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wave lengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard glutathione solutions (0–500 μM).

Glucose uptake assay. Glucose uptake was performed in hippocampal slices. Briefly, slices were transferred to 24-well plates and incubated for 30 min at 37°C in a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing (in mM): 137 NaCl, 5.36 KCl, 1.26 CaCl₂, 0.41 MgSO₄, 0.49 MgCl₂, 0.63 Na₂HPO₄·7H₂O, 0.44 KH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃, and 5.6 glucose, adjusted to pH 7.4. The assay was started by addition of 0.1 μCi/mL [2,3-³H]-D-glucose. The incubation was stopped after 30 min by removal of the medium and rinsing the slices twice with ice-cold HBSS. The slices were then lysed

in a solution containing 0.5 M NaOH. Radioactivity was measured in a scintillation counter. Nonspecific uptake was determined by using 25 μ M cytochalasin B. Final glucose uptake was obtained by subtracting the nonspecific uptake of the total glutathione to obtain the specific uptake.

BDNF concentration. BDNF protein was assessed using the ChemiKine brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Sandwich ELISA kit (Millipore, USA), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, the slices of hippocampus were individually homogenized in buffer containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.0), containing 2% bovine serum albumin (BSA), 1 M NaCl, 4 mM EDTA.Na₂, 2% Triton X-100, 0.1% sodium azide, and the cocktail protease inhibitors (Sigma). Samples were centrifuged for 30 min at 14,000 \times g. The supernatant was incubated on a 96-well microplate previously coated with anti-BDNF monoclonal antibody. After blocking, plates were incubated with biotinylated mouse anti-BDNF monoclonal antibody for 2 h and streptavidin-HRP conjugate solution for 1 h. Then color reaction with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate was quantified in a plate reader at 450 nm. The standard BDNF curve ranged from 7.8 to 500 pg/mL.

Statistical analysis. Parametric data from the experiments are presented as means \pm standard error and statistically evaluated by Student's *t*-test, assuming $p < 0.05$.

3. Results

No significant differences in S100B ($p=0.1$) content and GFAP ($p= 0.6$), as evaluated by ELISA, were observed in the hippocampus of rats submitted to wheel running. In contrast, we observed an increase in GS activity in exercised rats ($p =0.0002$, *Figure 1*). This exercise protocol did not change the glutamate uptake ($p=0.2$) and GSH level ($p=0.8$) in hippocampal tissue (*Figure 2*). The glucose ($p= 0.3$) uptake in hippocampus was not changed by this exercise protocol ($p=0.8$). However, the mean BDNF content was increased exercised rats ($p=0.01$) (*Figure 3*).

4. Discussion

Due to relevant participation of the astrocytes in the brain energetic metabolism and your involvement in many brain pathologies, becomes important the study of the effects

that physical exercise exerts on astrocytes aiming therapeutic neuroprotective strategies. This study investigated the effect of wheel running on the astrocytes in the hippocampus, namely, GFAP content, S100B content, glutamine synthetase activity, glutathione content, glutamate uptake, glucose uptake activities and BDNF content. Our results demonstrated that wheel running increased the GS activity and BDNF levels in hippocampus of rats.

GS is an enzyme exclusively located within astrocytes and oligodendrocytes in SNC (Ong et al., 1993). The “glutamate-glutamine cycle” makes neurons entirely dependent on astrocytes for their supplies of glutamate (Hertz et al., 1999). Until this moment, our laboratory seems to be the unique that investigate the effect of chronic wheel running on glutamine synthetase activity on hippocampus. Studies have demonstrated that the activity of GS declines with age, and that GS activity in the cerebral cortices of Alzheimer’s disease patients is substantially lower than that in age-matched controls (Smith et al., 1991, Hensley et al., 1995). One work showed that the amount of GS protein in AD brains is inversely correlated with the number of beta-amyloid plaques (Le Prince et al., 1995). Thus, the increase of GS activity promoted by voluntary exercise can be one of the mechanisms by which physical exercise ameliorates cognition and decreases the number of beta-amyloid plaques in patients with AD and animal models of dementia. However, more studies are needed for knowledge of the mechanisms of exercise in relation to GS activity and other astrocytic parameters.

GFAP has been shown to be involved in astrocyte functions, which are important during regeneration, synaptic plasticity and reactive gliosis (Eng et al., 2000). We investigated the GFAP content (by ELISA) on hippocampus of adult rats after 4 weeks of wheel running (12h during the dark cycle). Our result demonstrated that this type of exercise does not affect the GFAP content in this region. Conversely, Muller et al. (2011) found an increased number of GFAP-positive cells in the hippocampus of exercised animals on wheel running during 4 weeks, when compared with sedentary mice. In accordance, Steiner et al. (2004) showed that wheel running, but not environmental enrichment, strongly induced net astrogenesis (GFAP+/S100 β -) in hippocampus of mice. On the other hand, Latimer et al. (2011) examined the effects of wheel running on astrocytes within hippocampus and demonstrated a significant reduction by 30% in immunostaining of these cells (GFAP+) in exercised mice compared with controls. The differences found between these studies may be explained by a difference in the brain areas investigated, antibodies and techniques used, the staining methods applied and

animal type used (rat or mice). Among this, the different results can be because astrocytes are heterogeneous and these researches can have analyzed different subsets of astrocytes inside the one same region studied. Thus, more studies are needed for elicit this effect of wheel running on GFAP.

This study not found alteration in glutamate uptake by astrocytes after wheel running. The glutamate can be converted to glutamine in the glutamate-glutamine cycle, by glutamine synthetase enzyme, or enter like alpha-ketoglutarate in the Krebs cycle on astrocytes (Gonzalez and Salido, 2009). We suggest that in our voluntary model, wherever demonstrated increased of the GS activity without any change in the glutamate uptake, the glutamate uptake by astrocytes is preferentially used for production of glutamine and consequently turnover of glutamate and GABA on neurons. Other work also investigated the effect of wheel running on glutamate uptake in hippocampal and, conversely us, demonstrated an increased of glutamate uptake from exercised group relative to sedentary mice (Muller et al., 2011).

Our results also showed that rats submitted to voluntary wheel running not demonstrated changes in the glutathione levels, S100B content and glucose uptake in rats hippocampus. To our knowledge, this is the first report evaluating exercise effects on these astrocytic parameters in voluntary exercise protocol.

Among the neurotrophins, BDNF is a better candidate for mediating the long-term benefits of exercise on the brain (Cotman and Berchtold, 2002). This study shown that Wistar rats submitted to wheel running protocol presents increased the BDNF level in hippocampus, in according with others studies (Kitamura et al., 2003, Vaynman et al., 2004, Gomez-Pinilla et al., 2008, Khabour et al., 2010). One study *in vivo* using 2 weeks of daily voluntary wheel-running activity demonstrated that the exercise-induced expression of BDNF is associated with the increased expression of several key intermediates of the PI-3 kinase/Akt pathway, which is known for its role in enhancing neuronal survival (Chen and Russo-Neustadt, 2005). Specifically, this pathway is initially activated as a result of increased neural activity brought about by antidepressants and/or exercise (Chen and Russo-Neustadt, 2005). This neurotrophin was able to up-regulated GS in rat glaucoma model. The overexpression of BDNF gene protected retinal ganglion cells (Martin et al., 2003) and a possible mechanism underlying this neuroprotection is the ability of BDNF to up-regulate GS mRNA and protein (Dai et al., 2012). This is consistent with the protective function of Muller cells to promote detoxification via uptake of lethal levels of extracellular glutamate. One part

of the neuroprotective ability of BDNF is a consequence of its capacity to up-regulate GS in retinal ganglion cells culture under normal conditions (Dai et al., 2012). The increase in BDNF content possibly contributing, in our study, to increase the GS activity in hippocampal astrocytes. Moreover, other studies using wheel running have been realized for elicited this question.

In conclusion, our data show that wheel running was able to induce a increase of GS activity in rat hippocampus that could be mediated by BDNF, whose content were elevated in hippocampal tissue. We did not observe changes in other astroglial parameters. These results demonstrated that astrocytes are involved in the mechanisms by which wheel running promotes its effects on brain plasticity and reinforces the relevance of to study the astrocytes when searching to effective treatment strategies for brain diseases.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00 and INCT- National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

Conflict of Interests

There is no conflict of interests.

References

- Araque A, Navarrete M (2010) Glial cells in neuronal network function. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 365:2375-2381.
- Bergami M, Santi S, Formaggio E, Cagnoli C, Verderio C, Blum R, Berninger B, Matteoli M, Canossa M (2008) Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes. *The Journal of cell biology* 183:213-221.
- Bernardi C, Tramontina AC, Nardin P, Biasibetti R, Costa AP, Vizueti AF, Batassini C, Tortorelli LS, Wartchow KM, Dutra MF, Bobermin L, Sesterheim P, Quincozes-Santos A, de Souza J, Goncalves CA (2013) Treadmill exercise induces hippocampal astroglial alterations in rats. *Neural plasticity* 2013:709732.
- Browne RW, Armstrong D (1998) Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol* 108:347-352.
- Chen MJ, Russo-Neustadt AA (2005) Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Brain research Molecular brain research* 135:181-193.

- Correale J, Villa A (2009) Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochemical research* 34:2067-2077.
- Cotman CW, Berchtold NC (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in neurosciences* 25:295-301.
- Dai M, Xia XB, Xiong SQ (2012) BDNF regulates GLAST and glutamine synthetase in mouse retinal Muller cells. *Journal of cellular physiology* 227:596-603.
- Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology* 62:649-671.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research* 25:1439-1451.
- Feoli AM, Siqueira I, Almeida LM, Tramontina AC, Battu C, Wofchuk ST, Gottfried C, Perry ML, Goncalves CA (2006) Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition. *The Journal of nutrition* 136:2357-2361.
- Gomez-Pinilla F, Vaynman S, Ying Z (2008) Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *The European journal of neuroscience* 28:2278-2287.
- Goncalves CA, Leite MC, Nardin P (2008) Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical biochemistry* 41:755-763.
- Gonzalez A, Salido GM (2009) Ethanol alters the physiology of neuron-glia communication. *International review of neurobiology* 88:167-198.
- Hayes K, Sprague S, Guo M, Davis W, Friedman A, Kumar A, Jimenez DF, Ding Y (2008) Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta neuropathologica* 115:289-296.
- Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM, et al. (1995) Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of neurochemistry* 65:2146-2156.
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 57:417-428.
- Khabour OF, Alzoubi KH, Alomari MA, Alzubi MA (2010) Changes in spatial memory and BDNF expression to concurrent dietary restriction and voluntary exercise. *Hippocampus* 20:637-645.
- Kitamura T, Mishina M, Sugiyama H (2003) Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Neuroscience research* 47:55-63.
- Latimer CS, Searcy JL, Bridges MT, Brewer LD, Popovic J, Blalock EM, Landfield PW, Thibault O, Porter NM (2011) Reversal of glial and neurovascular markers of unhealthy brain aging by exercise in middle-aged female mice. *PloS one* 6:e26812.
- Le Prince G, Delaere P, Fages C, Lefrancois T, Touret M, Salanon M, Tardy M (1995) Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurochemical research* 20:859-862.
- Leite MC, Galland F, Brolese G, Guerra MC, Bortolotto JW, Freitas R, Almeida LM, Gottfried C, Goncalves CA (2008) A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *Journal of neuroscience methods* 169:93-99.
- Madsen PL, Hasselbalch SG, Hagemann LP, Olsen KS, Bulow J, Holm S, Wildschiodtz G, Paulson OB, Lassen NA (1995) Persistent resetting of the cerebral oxygen/glucose uptake ratio by brain activation: evidence obtained with the Kety-Schmidt technique. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 15:485-491.

- Martin KR, Quigley HA, Zack DJ, Levkovitch-Verbin H, Kielczewski J, Valenta D, Baumrind L, Pease ME, Klein RL, Hauswirth WW (2003) Gene therapy with brain-derived neurotrophic factor as a protection: retinal ganglion cells in a rat glaucoma model. *Investigative ophthalmology & visual science* 44:4357-4365.
- Muller AP, Gnoatto J, Moreira JD, Zimmer ER, Haas CB, Lulhier F, Perry ML, Souza DO, Torres-Aleman I, Portela LV (2011) Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus* 21:1082-1092.
- Nardin P, Tortorelli L, Quincozes-Santos A, de Almeida LM, Leite MC, Thomazi AP, Gottfried C, Wofchuk ST, Donato R, Goncalves CA (2009) S100B secretion in acute brain slices: modulation by extracellular levels of Ca(2+) and K (+). *Neurochemical research* 34:1603-1611.
- Ong WY, Garey LJ, Reynolds R (1993) Distribution of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in human cerebral cortical astrocytes--a light and electron microscopic study. *Journal of neurocytology* 22:893-902.
- Pietro Paolo S, Sun Y, Li R, Brana C, Feldon J, Yee BK (2008) The impact of voluntary exercise on mental health in rodents: a neuroplasticity perspective. *Behavioural brain research* 192:42-60.
- Rodrigues L, Dutra MF, Ilha J, Biasibetti R, Quincozes-Santos A, Leite MC, Marcuzzo S, Achaval M, Goncalves CA (2010) Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. *J Neural Transm* 117:1295-1305.
- Santin K, da Rocha RF, Cechetti F, Quincozes-Santos A, de Souza DF, Nardin P, Rodrigues L, Leite MC, Moreira JC, Salbego CG, Goncalves CA (2011) Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. *Brain research* 1421:1-10.
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:10540-10543.
- Steiner B, Kronenberg G, Jessberger S, Brandt MD, Reuter K, Kempermann G (2004) Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* 46:41-52.
- Thomazi AP, Godinho GF, Rodrigues JM, Schwalm FD, Frizzo ME, Moriguchi E, Souza DO, Wofchuk ST (2004) Ontogenetic profile of glutamate uptake in brain structures slices from rats: sensitivity to guanosine. *Mechanisms of ageing and development* 125:475-481.
- Tramontina F, Leite MC, Cereser K, de Souza DF, Tramontina AC, Nardin P, Andreazza AC, Gottfried C, Kapczinski F, Goncalves CA (2007) Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *Journal of neuroscience methods* 162:282-286.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999a) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:13427-13431.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999b) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience* 2:266-270.
- van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25:8680-8685.
- Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. *Journal of neuroscience research* 76:356-362.

Figures legends

Figure 1. Voluntary exercise increased GS activity in hippocampus of exercised rats. Effects of wheel running (12 hours/night, 5 times a week, for 4 weeks) on GFAP content and GS activity in the hippocampus were evaluated. The controls (SED) were exposed to new environment, by the same period, but the wheels running were blocked. GFAP content (evaluated by ELISA - panel A); GS activity (panel B). Values are mean \pm standard error of control/sedentary (SED) (n=6) and exercise (EXE) group (n=7). *Significantly different from respective control/sedentary group (Student's *t*-test, $p < 0.05$).

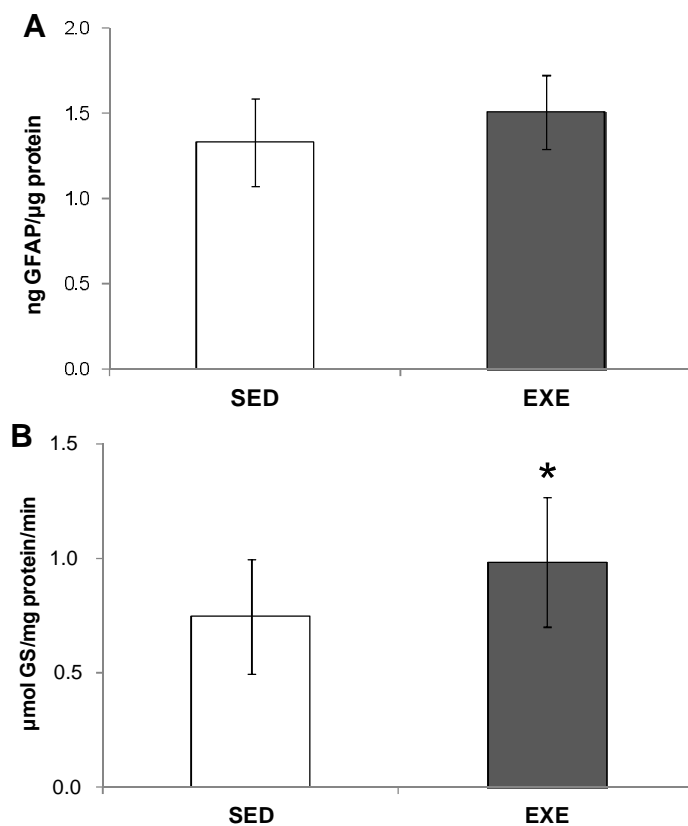


Figure 2. *Glutamate uptake and GSH content were not affected by wheel running.*

The rats (EXE) were exposed to wheel running during 4 weeks (12 hours/night, 5 times a week). The controls (SED) were exposed to new environment, by the same period, but the wheels running were blocked. Glutamate uptake and GSH in the hippocampus of rats submitted to voluntary exercise were analyzed. Hippocampi were dissected out and chopped into 0.3mm slices for measurement of glutamate uptake (panel A) or homogenized for measurement of GSH content (panel B). Values are mean \pm standard error of control/sedentary (SED) (n=10) and exercise (EXE) (n=10) group.

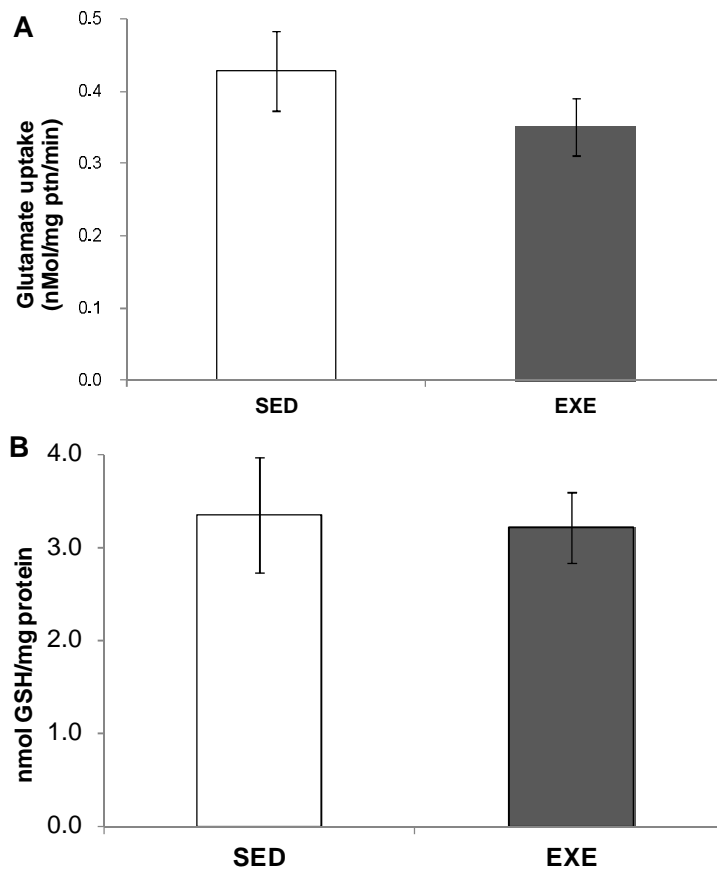
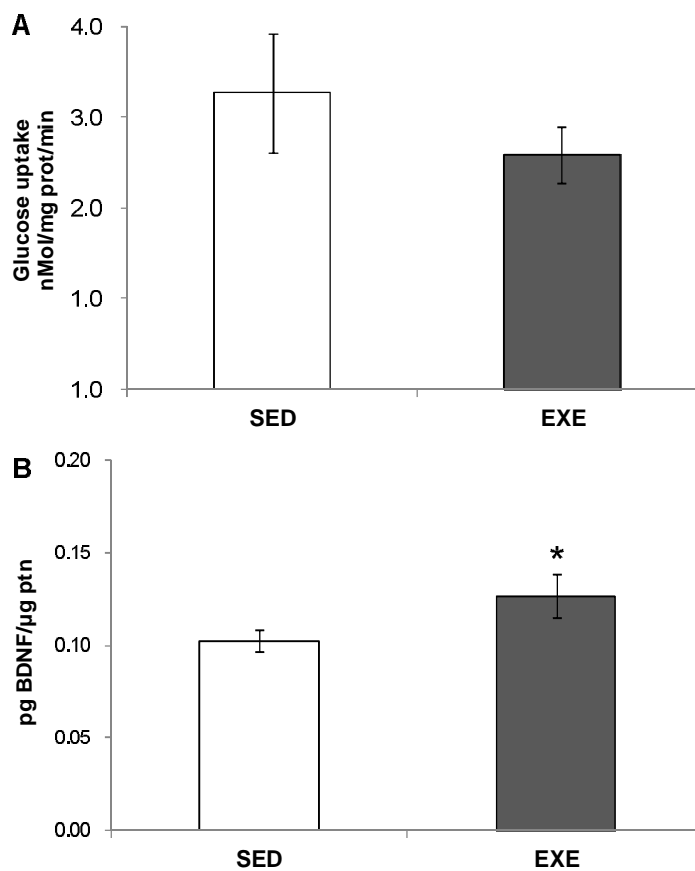


Figure 3. *Wheel running increased BDNF content in hippocampus.*

Glucose uptake and BDNF content in the hippocampus of rats (EXE) submitted to voluntary exercise (4 weeks, 12 hours/night, 5 times a week) were analyzed. The control rats (SED) were exposed to new environment, by the same period, but the wheels running were blocked. Hippocampi were dissected out and chopped into 0.3mm slices for measurement of glucose uptake (panel A) or homogenized for measurement (by ELISA) of BDNF content (panel B). Values are mean \pm standard error of control/sedentary (SED) (n=8) and exercise (EXE) (n=8) group. *Significantly different from respective control/sedentary group (Student's *t*-test, $p < 0.05$).



ARTIGO 3

Physical exercise prevents the LPS-induced TNF- α increment in rat hippocampus

Submetido à publicação.

PHYSICAL EXERCISE PREVENTS THE LPS-INDUCED TNF- α INCREMENT IN RAT HIPPOCAMPUS

Caren Bernardi^a, Adriana Fernanda Vizuet^b, Lucas Silva Tortorelli^b, Patrícia Nardin^b,
Regina Biasibetti^b, Fabiana Galland^b, Cristiane Batassini^b, Maria Cristina Guerra^b,
Carlos Aberto Gonçalves^{a,b}.

^a Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author: Caren Bernardi

Departamento Bioquímica, UFRGS

Ramiro Barcelos, 2600 - anexo

Porto Alegre, RS, Brazil

90035-003

Fax: 55-51-3308 5535

E-mail: carenbernardi@hotmail.com

Abstract

The hippocampus is highly sensitive and strongly affected by the systemic administration of lipopolysaccharide (LPS), a product of the wall of gram-negative bacteria. There is evidence that LPS impairs memory process, reduces neurogenesis and increases apoptosis in this brain region. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) may be one of the mediators in the cognitive impairments associated with brain inflammation. Physical exercise has been known to affect the periphery immune system and the astrocytes and appears to contribute to inflammatory profile improvement in several diseases. This study evaluated the preventive effects of moderate exercise (treadmill, 20 min/day for 2 weeks) in rats that were submitted to LPS-systemic administration (1mg/kg i.p.). Learning and memory were evaluated using the object recognition task. Astroglial markers, such as glial fibrillary acidic protein, S100B protein and glutamine synthetase were evaluated, as well as the content of TNF-alpha and brain derived neurotrophic factor. Our results show that regular moderate-running exercise protects the hippocampus against the elevated expression of TNF- α after LPS administration. Cerebrospinal fluid S100B was increased by exercise. In conclusion, exercise prior to the onset of systemic inflammation appears to foster protective mechanisms in the hippocampus.

Key words: Inflammation; physical exercise; astrocyte; TNF-alpha; S100B; hippocampus.

Introduction

The beneficial effects of exercise on the brain are becoming increasingly evident [1]. Many studies have associated the practice of exercise with the prevention or reduction of the deleterious effects of pathological brain conditions, such as Parkinson's [2] and Alzheimer's disease [3, 4], vascular dementia [5], ischemia [6, 7], traumatic brain injury [8] and psychiatric disorders [9-11]. Furthermore, recent studies have focused on the role of physical exercise in the improvement of the inflammatory profile in diseases associated with systemic and/or brain inflammation [12].

Research suggests that various neurological diseases, such as Alzheimer's disease and stroke, have an inflammatory component, and that systemic infection and inflammation can affect these pathologies [13]. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is believed to be one of the mediators of these pathophysiological processes that underlies the cognitive impairments associated with several neuropsychiatric [14, 15] and neurological diseases [16, 17] making this cytokine an ideal target for therapeutic intervention.

Studies have demonstrated that the administration of lipopolysaccharide (LPS), a bacterial endotoxin, and consequently activation of proinflammatory cytokines, reduces neurogenesis [18, 19] and increases apoptosis in the brain [20, 21]. The hippocampus is highly sensitive to LPS, which affects neuronal activity and neurogenesis [18, 19, 22] as well as impairs certain memory processes in tasks, such as contextual-cue fear conditioning [23], water maze [24], Y-maze [25] and object recognition [26].

Astrocytes are also affected by LPS via toll-like receptor-4 (TLR4) [27]. The cells are involved in metabolic support for neurons, antioxidant defense [28], secretion of neurotrophic factors such as BDNF [29] and S100B [30, 31], and together with microglia, in the brain inflammatory response. Extracellular S100B plays a trophic role

on neurons in culture [30] and hippocampal activity *in vivo* [32, 33]. However, elevated extracellular levels of this protein seems to exert a neurotoxic effect [30, 34]. However, when activated, they can secrete inflammatory mediators to exert neurotoxic effects [35], killing neurons [36-38]. Astrocytes also exert roles in protecting the CNS against neurotoxicity by the producing glutathione (Dringen, 2000) and neurotrophins, such as S100B and BDNF [29]. Astrocytes represent the principal source of S100B, since they actively release this protein in response to a variety of stimuli [34, 39, 40].

S100B is a calcium-binding protein that exerts intracellular and extracellular effects [33]. A study of the extracellular effect of S100B on neural cultures demonstrated that it is neurotrophic at nanomolar levels and apoptotic at micromolar levels [39]. Among its neurotrophic effects, studies have shown that S100B promotes long-term functional recovery after traumatic brain injury [33], protect astrocytes and microglia against trimethyltin (TMT) toxicity [41] and ameliorates long-term memory [32]. Astrocytes are also responsible for the secretion of BDNF in its precursor form (pro-BDNF) and for clearance of the neuronal BDNF from the extracellular space [29]. The astrocyte-mediated clearing and recycling of BDNF share some similarities with the astrocyte clearance of glutamate from the synaptic cleft [29]. BDNF plays a role in the survival and growth of neurons, hippocampal-dependent learning and memory, neurogenesis and synaptic plasticity [24] and can provide neuroprotection from a variety of insults [42].

Physical exercise has been known to affect the periphery immune system [43, 44] and the astrocytes in the SNC [45-47]. Increased expression of BDNF seems be a central factor in exercise-derived benefits to brain function [42] and more recent studies have investigated the effects of physical exercise on S100B in neuropathological conditions [46-48]. Recently we investigated astroglial parameters in rats submitted to

four weeks of treadmill exercise [49]. Reports have demonstrated the beneficial role of physical exercise in neuroinflammatory conditions, such as Alzheimer's [3] and Parkinson's [2] disease, and it has also been shown that exercise reduces the expression of pro-inflammatory cytokines in the periphery [50] and restores impaired spatial learning and memory ability after LPS systemic administration [51]. To study the benefits of physical exercise in rodents, two exercise protocols exist: voluntary and forced. The forced protocol uses treadmill running and presents advantages such as forcing the animals to run according to the experimenter's demands [52]. In this study, we chose the treadmill exercise (2 weeks of 20 min/day) protocol for this reason and due to the fact that daily moderate intensity treadmill running (2 weeks of 20 min/day) is reported to have neuroprotective properties, reducing damage to hippocampal slices from Wistar rats submitted to *in vitro* ischemia [53], facilitating inhibitory avoidance memory and inducing time-dependent changes in COX-2 pathway function (COX-2, PGE2 and EP receptors) [54]. Studies from our group have also demonstrated that the use of this treadmill protocol (20min/day at 60% maximal capacity of exercise) for 4 weeks exerts an effect on astrocytes [49]. Although physical exercise may be useful in neurorehabilitation [1], little information is available regarding the preventive role of exercise on deleterious effects induced by brain inflammation. Furthermore, only a few studies have investigated whether the LPS and physical exercise has effects on non-spatial forms of learning and memory, such as the object recognition task, a non-stress and hippocampal-dependent task [55].

The purpose of this study was to examine the effects of moderate-intensity exercise on biochemical parameters such as S100B, TNF-alpha and BDNF contents in hippocampus, as well as on cognitive evaluation, in rats submitted to acute systemic

LPS administration. Beyond S100B, other parameters dependent on astroglial activity, were investigated such as glutathione content and glutamine synthetase.

Material and methods

Animals

Forty male Wistar rats (90-days old, weighing 250-320 g) were obtained from our breeding colony (at the Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul) and were maintained under controlled light and environmental conditions (12 h light/12 h dark cycle at a constant temperature of $22 \pm 1^\circ \text{C}$) with free access to food and water. All animal experiments were carried out in accordance with the National Institute of Health Guide of the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996, and following the regulations of the local animal house authorities (UFRGS, 19872).

Adaptation to treadmill and maximal exercise test

To perform the training, all animals were adapted to walk on a treadmill for three consecutive days (Days 1 to 3). This adaptation consisted of walking on a treadmill for 10 min at 5 m/min. On the fourth day, animals were submitted to the maximal exercise test (MET). The MET was used to determine the maximal exercise capacity (MEC). The test consisted of a graded exercise on a treadmill, with speed increments of 5 m/min every 3 min, starting at 5 m/min and continuing up to the MEC of each rat [56]. Values attained for the MET were used to plan the treadmill training program.

After the test, the animals were randomly grouped as follows: control/sedentary group (SED) (N=20) and exercise group (EXE) (N=20).

Treadmill training

The exercise training consisted of running sessions on an adapted motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) at 60% of MEC (maximal velocity). Treadmill training was performed between 8:00 and 12:00h. The animals ran for 20 minutes, daily, for 2 weeks. Selected animals that initially refused to run were encouraged by gently tapping their backs. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study. The control/sedentary group was transported to the experimental room and handled exactly as the experimental animals were and maintained in the turned off treadmill for 5 min without forcing them to run [53].

LPS administration

Immediately after the last exercise session (20 min/day during two weeks), the animals were randomly grouped as follows: sham-sedentary (N=10), sham-exercise (N=10), LPS-sedentary (N=10) and LPS-exercise (N=10). LPS was administered intraperitoneally (i.p.) at a dose of 1mg/kg body weight (from *E. coli* serotype 055B5; toxicity 1.5×10^6 , Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). The injection was performed in the morning. An appropriate volume of the phosphate-buffered saline (3 mL) was injected in control animals. A schematic representation of the experimental procedure is shown in **Fig.1**, indicating times of adaptation to the treadmill, treadmill training, LPS administration, cognitive behavior and biochemical analysis.

Body temperature

Body temperature was measured using a digital clinical ear thermometer via infrared (model IR1DB1, G.TECH[®]). The temperature was taken at 6 hours after LPS or saline treatment.

Motor skills assessment

Motor balance and coordination (test) were evaluated six hours after the systemic LPS administration using a Rota-rod apparatus (Insight®, 54x54x42cm). On the first day (one day before LPS injection), the rats were transported (within their home cage) to acclimatize to the testing room for 1 h prior to the start of training. The Rota-rod task consists of a cylinder placed 20 cm above the table surface and driven by a motor adjusted to a maximum speed of 37 rpm. To keep on the revolving cylinder, the animal needs to move about, so its motor skills capacity can be quantified as the latency to fall off the cylinder. Every rat received a training session on the Rota-rod set at a constant speed of 8 rpm and was tested until they achieved a criterion of remaining on the rotating spindle for 60 seconds. A single baseline trial on the accelerating Rota-rod was run in which the spindle speed increased from 8 or 37 rpm over a period of 5 min. The test session, 24 hours after the training and 6 hours after LPS administration, was made in the accelerating mode and the latency to fall off was recorded. The task timeout was 300 seconds [57].

Object-recognition task

The object-recognition task was performed twenty-four (short-term memory) and forty-eight hours (long-term memory) following the systemic LPS administration. The apparatus consisted of a black square open field, placed in a room. Rats were acclimatized for 3 days in the procedure room and handled during 1 minute per day to minimize the stress and novelty of handling and transport procedure that can adversely affect object interaction. Training was performed on the fourth day. The animals were habituated for 10 min in the environment before object exposure. The training consisted of placing the two identical to-be-familiarized (sample) objects in the back left and right corners of the apparatus. The rat was then placed at the mid-point of the wall opposite

the sample objects. After 10 minutes, the animal was removed from the apparatus and returned to the colony for the prescribed training-to-testing interval (3 hours). The apparatus and objects were cleaned with 70% isopropyl alcohol after each animal had been assessed to ensure the absence of olfactory cues. During the session, one of the familiar sample objects was placed in one back corner of the apparatus and the novel object was placed in the other back corner. The duration of the test session was 2 minutes. The rats were then removed and returned to the colony. The objects were children's toys that were all of a similar size, surface complexity and material. The criteria for exploration were strictly based on active exploration, in which rats had to be touching the object with at least their noses. Measurement of the time spent exploring each object was determined by a discrimination ratio (DR) (novel object interaction/total interaction with both objects) [58]. When $DR < 50$, it was concluded that the rat did not recognize the familiar sample object, if $DR > 50$, the rat was interpreted as remembering the object [59].

Cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples

Seventy-two hours after LPS administration (i.p.), animals were anesthetized with ketamine and xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively, i.p.), and then positioned in a stereotaxic holder for cerebrospinal fluid (CSF) collection from the cisterna magna. The puncture was performed using an insulin syringe (27 gauge x 1/2" length). Rats were then removed from the stereotaxic apparatus and placed in a flat place; whole blood was obtained through an intracardiac puncture using a 0.37-mm diameter needle that was inserted into the intercostal space above the sternum. Serum was separated by centrifugation at 3000xg for 5 min. CSF and serum samples were frozen ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) until further analysis [60].

Hippocampal tissue samples

Seventy-two hours after the LPS injection, the animals were killed by decapitation, brains were removed and placed in cold saline medium with the following composition (in mM): 120 NaCl; 2 KCl; 1 CaCl₂; 1MgSO₄; 25 HEPES; 1 KH₂PO₄ and 10 glucose, adjusted to pH 7.4, and previously aerated with O₂. The hippocampi were dissected out and transverse slices of 0.3 mm were obtained using a McIlwain Tissue Chopper. Slice samples (hippocampus) were then frozen (−80 °C) for biochemical measurements, described as follows.

Quantification of S100B

S100B content in the hippocampus, CSF and serum was measured by ELISA [61]. Briefly, 50 µL of sample plus 50 µL of Tris buffer were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti-S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti rabbit antibody was added for a further 30 min. A colorimetric reaction with *o*-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.020 to 10 ng/mL.

Glutamine synthetase (GS) activity

The enzymatic assay was performed, as described previously [62]. Briefly, homogenized tissue samples were added to a reaction mixture containing (in mM): 10 MgCl₂; 50 Lglutamate; 100 imidazole–HCl buffer (pH 7.4); 10 2-mercaptoethanol; 50 hydroxylamine–HCl; 10 ATP and incubated for 15 min at 37 °C. The reaction was stopped by the addition of 0.4 mL of a solution containing: 370 mM ferric chloride; 670 mM HCl; 200 mM trichloroacetic acid. After centrifugation, the supernatant was measured at 530 nm and compared to the absorbance generated by standard quantities

of γ -glutamylhydroxamate treated with ferric chloride reagent. Glutamine synthetase activity was expressed as $\mu\text{mol}/\text{mg prot}/\text{min}$.

Glutathione (GSH) content assay

GSH levels were measured as previously described [63]. This assay detects only the reduced glutathione content. Briefly, homogenized slices were assayed in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 5 mM EDTA and protein was precipitated with 1.7% meta-phosphoric acid. Supernatant was assayed with *o*-phthaldialdehyde (1 mg/mL methanol) at room temperature for 15 min. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 350 and 420 nm, respectively. A calibration curve was performed with standard glutathione solutions (0– 500 μM). Glutathione concentrations were expressed as nmol/mg protein.

Evaluation of intracellular reactive oxygen species (ROS) production

Intracellular ROS production was detected using the non-fluorescent cell permeating compound, 20–70-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA). DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to dichlorofluorescein (DCFH), which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by the action of cellular oxidants. Samples homogenized in sodium phosphate buffer, pH 7.4 with 140 mM KCL, were treated with DCF-DA (10 μM) for 30 min at 37°C. Following DCFH-DA exposure, the cells were scraped into PBS with 0.2% Triton X-100. The fluorescence was measured in a plate reader (Spectra Max GEMINI XPS, Molecular Devices, USA) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm [64].

BDNF measurement

The BDNF protein was assessed using the ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA kit (Millipore, USA), according to the manufacturer's recommendations. Briefly, the slices of hippocampus were individually homogenized in

homogenization buffer containing: 100mM Tris-HCl (pH 7.0), containing 2% bovine serum albumin (BSA), 1M NaCl, 4mM EDTA.Na₂, 2% Triton X-100, 0.1% sodium azide and the cocktail protease inhibitors (Sigma®). Samples were centrifuged for 30 min at 14,000xg. The supernatant was incubated on a 96-well immunoplate previously coated with anti-BDNF Monoclonal Antibody. After blocking, plates were incubated with biotinylated mouse anti-BDNF monoclonal antibody for 2 h and streptavidin-HRP conjugate solution for 1h. Then color reaction with TMB/E substrate was quantified in a plate reader at 450 nm. The standard BDNF curve ranged from 7.8 to 500 pg/ml.

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) measurement

This assay was carried out in 50 μ L of hippocampus sample, using a rat TNF- α ELISA from eBioscience (San Diego, USA).

Statistical analysis

Parametric data are from the experiments are presented as mean \pm standard error and statistically evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test when indicated, assuming $p < 0.05$. Blood lactate concentration was statistically evaluated by Student's *t*-test.

Results

Exercise protocol

The treadmill exercise (20 min/day during 2 weeks) used in this study is considered of moderate intensity and aerobic (Cechetti et al, 2008). The concentration of blood lactate in the exercise groups (mean=2.4 \pm 0.3) remained below the anaerobic threshold of 7.17 \pm 0.16 mM, confirming that this protocol is aerobic. No significant difference was observed in blood lactate concentration between sedentary and exercise groups ($p=0.22$).

Body temperature of animals

LPS administration promoted a significant febrile reaction at 6 h afterwards in the sedentary (SED+LPS) and exercised (EXE+LPS) groups, when compared with the control groups ($F_{(3,37)} = 17.69, p = 0.000$) (**Fig. 2**).

Motor activity assessment

Two-way ANOVA revealed significant effects of the factor LPS and exercise on the latency to fall off the cylinder in the rota-rod test session ($F_{(3,33)} = 14.08, p = 0.000$). Control rats (sedentary or exercised), which showed a regular stepping pattern and fluent walking, performed significantly better than LPS-injected groups. The SED+LPS group displayed a poor performance, when compared with the EXE+SAL group ($p = 0.034$), while the EXE+LPS group had the worst performance in this task, compared with the other groups (**Fig. 3**).

Object-recognition task

Short and long-term object recognition (24 h and 48 h afterwards, respectively) were used to assess non-spatial forms of learning and memory. All animals across the treatment groups showed a significant discrimination between the novel and familiar objects, spending a higher percentage of time exploring the novel object, compared to the familiar one. This was demonstrated by the discrimination ratio of above 0.5. This result indicated that neither acute LPS administration nor treadmill running altered short ($F_{(3,40)} = 1.83, p = 0.15$) and long-term object recognition ($F_{(3,40)} = 2.75, p = 0.84$) (**Fig. 4**).

TNF- α and BDNF content

Statistical analysis showed a significant group effect ($F_{(3,39)} = 4.19, p = 0.01$) for the hippocampal content of TNF- α . The hippocampal TNF- α content at 3 days after the LPS administration was significantly higher in the SED+LPS group than in the SED+SAL

group ($p = 0.009$). TNF- α content in the EXE+LPS group did not differ from that of the control group, demonstrating that treadmill exercise was effective in the prevention of the augmentation of TNF- α content that is induced by inflammation. In contrast, the hippocampal BDNF content was not altered by LPS injection nor the exercise protocol ($F_{(3,40)} = 1.14, p = 0.34$) (**Fig.5**).

S100B and GS hippocampal

The glutamine synthetase and S100B protein have been used to characterize astrocyte activity (Vicente et al, 2007). No significant differences in GS activity ($F_{(3,38)} = 2.09, p = 0.12$) nor S100B content ($F_{(3,37)} = 0.59, p = 0.62$) parameters were observed at 3 days after LPS administration, or when comparing all four groups. This result suggests that this acute inflammation model does not produce reactive gliosis in the hippocampus of rats (**Fig. 6**).

GSH and DCF levels

LPS administration and treadmill exercise did not modify any oxidative stress parameters in the hippocampus 3 days afterwards. There were no significant differences in the four groups in relation to free radicals ($F_{(3,39)} = 0.95, p = 0.42$) and glutathione (GSH) levels ($F_{(3,39)} = 2.30, p = 0.09$) (**Fig. 7**).

S100B CSF and serum

Two-way ANOVA analysis showed a significant group effect for the CSF ($F_{(3,30)} = 14.45, p = 0.000$) and serum ($F_{(3,40)} = 3.46, p = 0.02$) in rats. Our results showed that acute administration of LPS caused a decrease in S100B levels in the LCR in the SED+LPS group, compared to the EXE+SAL ($p=0.002$) or EXE+LPS ($P=0.000$) groups. Treadmill exercise increased the S100B levels in the LCR of saline and LPS-administrated rats. Peripherally, the serum S100B content demonstrated a similar profile, where the SED+LPS group demonstrated a significant decrease in S100B levels, compared with

the EXE+SAL group. The serum S100B level in the LPS-treated rats that performed physical exercise was not different to that of the EXE+SAL group (**Fig. 8**).

Discussion

The present study was designed to evaluate the influence of physical preconditioning by treadmill running on the hippocampal inflammation induced by systemic-LPS administration. Our results show that regular moderate-running exercise (20 min/day, 2 weeks) protects the hippocampus from an elevated expression of TNF- α . Previous studies have demonstrated that LPS administration and activation of proinflammatory cytokines, such as TNF- α reduces neurogenesis [18, 19] and increases apoptosis in the brain [65]. Therefore, increases in levels of pro-inflammatory cytokines are involved in pathologies such as Alzheimer's disease, multiple sclerosis, stroke and neuropsychiatric disorders [16, 66, 67]. We also demonstrated that the advantageous effect of running exercise in preventing LPS-induced alterations may be mediated by the up-regulation of S100B levels in the CSF.

The peripheral (i.p) administration of LPS at a dose of 1mg/kg body weight, which does not induce sepsis in rats, causes a systemic inflammation [68] that is characterized by a sickness behavior that includes temperature alterations [69, 70] and decreased locomotor activity [71, 72]. In our study, LPS-injected rats presented increases in body temperature and a shorter latency-to-fall in the Rota-rod task, indicating that the LPS administration effectively promoted a sickness behavior. The EXE+LPS group had the worst performance, compared to the other groups in the Rota-rod task. It is important to highlight that this motor performance was evaluated at 6 hours after LPS administration and this point coincided with the high body temperature presented by animals [73]. At this moment, physical exercise, which was performed 6

hours before the task, may act as a stressor, increasing the intensity of the sickness behavior in the EXE+LPS group.

TNF- α signaling is critically involved in the disruption of patterns of hippocampal activity underlying learning and memory, and the inhibition of TNF- α synthesis has been demonstrated to restore cognitive function from a behavioral and cellular prospective [74]. Spatial learning requires integrative control functions of the hippocampus and it has been demonstrated that peripheral administration of LPS interrupts the spatial memory in the Morris Water Maze and Y-maze test [24, 25, 51, 75]. The object-recognition is also a task dependent on hippocampus and it is inhibited by LPS [59, 76, 77]. However, our results demonstrated that systemic LPS-administration does not affect the short and long-term object recognition task, in agreement with other studies [74, 75]. These apparently divergent results can be due to different parameters utilized in these studies, including type of animal (F344 vs. Wistar rats), administration route (intraperitoneal vs. intracerebroventricular), doses per weight, time of administration (acute vs. chronic) and time at which behavioral task was performed (hours vs. days after LPS). For example, Belarbi, et al. [74] observed that rats with chronic neuroinflammation induced by LPS displayed an impaired performance in spatial-learning and memory-retention tests, but not in the novel-object-recognition test.

Astrocytes are activated in response to damage to the CNS and show higher levels of adhesion molecules and an increased production of a variety of cytokines, chemokines, growth factors, neuropeptides [78] and reactive oxygen species (ROS) [79, 80], consequently eliciting a brain inflammatory response. Astrogliosis can be considered an attempt to restore homeostasis in the damaged brain through important functions including glial scar formation, regulation of immune responses, and the

modulation of neuronal survival and neurite outgrowth [81]. Two factors are established markers of astrogliosis in several paradigms: glutamine synthetase (GS) [82, 83] and S100B protein [84-87]. In our conditions, the inflammation induced by LPS administration did not cause astroglial activation in hippocampus, since no alterations were observed in GS activity and S100B content. Additionally, oxidative stress was not observed in this model since, as there were no alterations in the production of reactive species of oxygen and glutathione levels. However, we cannot exclude that TNF- α increment in hippocampal tissue does not involve astroglial activation.

Endothelial signaling after the peripheral administration of lipopolysaccharide enhances the transport of proinflammatory cytokines across the blood-brain barrier (BBB) [88]. The binding of LPS to the CD14/MD-2/toll-like receptor 4 (TLR-4) complex leads to the production of TNF- α , which may adversely affect the functions of the CNS [73]. We demonstrated that peripheral LPS administration induces an increase in TNF- α levels in the hippocampus of rats, confirming previous studies [22, 89]. Acute bout of treadmill exercise has been reported to inhibit the plasmatic TNF- α elevation induced by LPS administration [90, 91]. Our findings are consistent with these studies, demonstrating that short-term treadmill exercise pre-conditioning reduces the hippocampal TNF- α levels that are increased by LPS administration, preventing the deleterious effects of the up-regulation of this cytokine in the hippocampus. To our knowledge, this is the first report to evaluate short-term exercise pre-conditioning effects on the prevention of TNF- α level alterations caused by periphery LPS-administration in hippocampus.

One mechanism suggested to mediate the advantageous effects of treadmill running on LPS-induced injuries is the up-regulation of BDNF signaling [51]. Our results contrasted to those of previous studies demonstrating that physical activity

increases the expression of BDNF in the rodent brain [92-94]. In the protocol used in our study (20 min/day, 2 weeks), we found no alterations in the BDNF levels in sedentary and exercised rats, as observed by Cechetti, et al. [95]. Since this exercise protocol was found to protect against brain insults [53, 96, 97] and improved the memory by antiinflammatory mechanisms [54], our results indicate that the neuroprotective effect of this treadmill exercise protocol may not be dependent upon BDNF expression [95].

In relation to effects of LPS on BDNF expression, the existing reports relate conflicting results *in vitro* and *in vivo* studies, possibly due to different experimental conditions. Elkabes, et al. [98] found that BDNF expression was unaltered in microglia culture in the presence of LPS, whereas Miwa, et al. [99] found that LPS stimulates the synthesis of BDNF in microglia culture. Guan and Fang [100] demonstrated that LPS (at 1.0 mg/kg) causes a decrease in BDNF expression at 7 hours after LPS administration in the hippocampus and cortex of Sprague-Dawley rats. Shaw, et al. [24] found there were no differences in gyrus dentate BDNF concentration between the different treated groups and controls after LPS administration (at 0.1 mg/kg) in Wistar rats. We also did not observe alterations in hippocampal BDNF levels three days after intraperitoneal injection of LPS.

Other important aspect observed was the increase of cerebrospinal fluid (CSF) S100B induced by exercise. We have observed decrease of CSF S100B in many conditions of chronic brain injury such as streptozotocin-induced dementia [101, 102], chronic cerebral hypoperfusion [103] and okadaic acid-induced hippocampal lesion [104]. On other hand neuroprotective strategies including physical exercise reverted this decrease in streptozotocin-induced dementia [47]. With regard to the mechanism that may elicit the preventive effect of treadmill running on brain

inflammation, our results suggest that the S100B protein may exert an important role. Results in cell culture have shown that S100B stimulates neurite outgrowth [105], astrocyte proliferation [106] and protects against glutamate-toxicity [107, 108]. Moreover, some acute increments in CSF S100B in conditions of brain injury seems to contribute to brain recovery [109]. Therefore, a CSF S100B decrease induced by LPS could affect its neurotrophic activity and physical exercise pre-conditioning would be able to prevent this decrease. This protein, in mM levels, promotes toxic effects such as astrocyte and neuronal death [110, 111]. In relation to its toxic effect, studies have demonstrated high levels of S100B in the serum and CSF in a variety of brain pathologies [112] and these levels have been used as markers of brain insult [113-116]. However, many investigations have confirmed the neuroprotective and neurotrophic effects of S100B on neurons at low concentrations [117-119]. Although true cerebral S100B levels are more accurately assessed from S100B measurements in the cerebrospinal fluid in humans [120-122], the exact function and effects of increased cerebral levels of S100B after brain injury are not yet thoroughly understood. Whether the increase in S100B in the CSF is part of a compensatory response, or contributes to the pathology, has not been clarified yet.

Our results demonstrate that treadmill running increased S100B levels in the CSF, in association with the prevention of high TNF- α content in the hippocampal of exercised rats injected with LPS. Other studies have shown the preventive effect of S100B. Reali, et al. [41] demonstrated that nocive responses to trimethyltin (TMT) treatment can be prevented by pretreatment of astrocyte and microglia cultures with nanomolar doses of S100B; S100B modifies basal expression of TNF- α in astrocytes by activation of NF-kB in glial cells [41, 123]. Results suggest that S100B might play a role in maintaining TNF- α levels low under normal conditions and probably during the

early stages of brain injury. Another study demonstrated that S100B, secreted during the glial response to brain injury, exerts neuroprotective and neuroregenerative effects in psychiatric disorders; authors suggested that activation of NF- κ B, possibly via the MEK/ERK pathway, is required for the neuroprotective and potentially neuroregenerative effects of S100B [107]. Furthermore, S100B has been reported have a positive effect on the consolidation of memory [32], improving neurogenesis and cognitive recovery after traumatic brain injury [109, 124]. In addition, extracellular S100B protects hippocampal neurons against excitotoxic injury [107, 125]. These actions on CSF S100B induced by treadmill running may be relevant to understanding the neuroprotection induced by physical exercise.

In our study, the CSF S100B level was decreased in the sedentary rats that received LPS injections, compared with the exercised control rats. In regard to the decrease in S100B in infected rats, Ohtaki, et al. [126] demonstrated that the expression of this protein is significantly reduced in persistently-infected brains in rats with Borna disease virus (BDV), suggesting that this down-regulation may be associated with the duration of CNS inflammatory responses, possibly due to the chronic expression of inflammatory mediators. Other studies have also shown that gamma interferon treatment down-regulates S100B gene expression in primary mouse astrocytes [127]. Based in these observations, it may be suggested that the decrease in CSF S100B levels in systemic LPS-treated rats are related to the chronic expression of inflammatory mediators, since TNF- α remained increased at 72 hours after LPS administration in the SED+LPS group.

Several studies have reported that physical exercise (i.e. basketball, running, soccer, swimming, boxing) increase serum S100B levels [128-133]. This increase does not seem to be related to the effect of acceleration/deceleration, since bungee jumping

did not affect S100B release [134]. Another study evaluated serum S100B in swimmers and reported an increased level post-exercise, compared with rest, in the same subjects [129]. These authors strongly suggest that this increase was not related to brain injury, but that physiological mechanisms involving the release of hormones and excitatory neurotransmitters during exercise stimulate the secretion of S100B by astrocytes [135]. In this regard, the extracerebral sources of S100B should be considered (e.g. adipocytes, Schwann cells, melanocytes and chondrocytes), as well as their influence on blood levels of this protein [136]. The increased serum S100B levels in exercised rats may be related to its trophic activity in the brain, rather than injury [135]. Thus, according to experimental evidence that physical exercise stimulates the synthesis and release of trophic factors in the brain [42, 137, 138], promoting plasticity and cerebral resistance, we suggest that the increased S100B levels in the serum are related to the trophic action of this protein in the brain. In spite of increase of CSF S100B we did not find a significant increase of serum S100B induced by treadmill running. This in agreement with that idea that CSF S100B changes are not necessarily accompanied by serum S100B changes [31]. Moreover, we find a decrease of serum S100B in LPS treated group. Physical exercise did not increase serum S100B but it prevented the decrease induced by LPS.

Conclusion

Astrocytes play important roles in host defense during brain infection and inflammation, producing pro-inflammatory mediators, such as TNF- α , in response to pathologic stimuli such as LPS. This study shows a correlative relationship between treadmill running and reduced TNF- α content in the hippocampus after acute LPS administration. This neuroprotection could involve the elevation of S100B, a neurotrophic protein derived from astrocytes. This finding may not only clarify

mechanisms of exercise-induced neuroprotection, but also may help in the development of new strategies for inflammation therapy. To our knowledge, this is the first study showing changes in S100B in exercised rats exposed to LPS stress. Our data suggest that physical training may be a strategy to prevent acute inflammation, which leads to long-term cell damage, and may be therapeutically useful in the treatment of cognitive deficits associated with neuroinflammatory diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease, multiple sclerosis, stroke and some psychiatric disorders.

Acknowledgements

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FINEP/ Rede IBN 01.06.0842-00 and INCT- National Institute of Science and Technology for Excitotoxicity and Neuroprotection.

Conflict of Interests

There are no conflict of interests.

References

- [1] E. T. Ang and F. Gomez-Pinilla, "Potential therapeutic effects of exercise to the brain," *Curr Med Chem*, vol. 14, pp. 2564-71, 2007.
- [2] S. Y. Wu, T. F. Wang, L. Yu, C. J. Jen, J. I. Chuang, F. S. Wu, C. W. Wu, and Y. M. Kuo, "Running exercise protects the substantia nigra dopaminergic neurons against inflammation-induced degeneration via the activation of BDNF signaling pathway," *Brain Behav Immun*, vol. 25, pp. 135-46, Jan 2011.
- [3] Y. H. Leem, Y. I. Lee, H. J. Son, and S. H. Lee, "Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 406, pp. 359-65, Mar 18 2011.
- [4] A. Zanesco and E. Antunes, "Effects of exercise training on the cardiovascular system: pharmacological approaches," *Pharmacol Ther*, vol. 114, pp. 307-17, Jun 2007.
- [5] A. F. Kramer, K. I. Erickson, and S. J. Colcombe, "Exercise, cognition, and the aging brain," *J Appl Physiol*, vol. 101, pp. 1237-42, Oct 2006.
- [6] M. Guo, B. Cox, S. Mahale, W. Davis, A. Carranza, K. Hayes, S. Sprague, D. Jimenez, and Y. Ding, "Pre-ischemic exercise reduces matrix metalloproteinase-9 expression and

- ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke," *Neuroscience*, vol. 151, pp. 340-51, Jan 24 2008.
- [7] J. Li, X. Luan, J. C. Clark, J. A. Rafols, and Y. Ding, "Neuroprotection against transient cerebral ischemia by exercise pre-conditioning in rats," *Neurol Res*, vol. 26, pp. 404-8, Jun 2004.
- [8] B. C. Mota, L. Pereira, M. A. Souza, L. F. Silva, D. V. Magni, A. P. Ferreira, M. S. Oliveira, A. F. Furian, L. Mazzardo-Martins, M. D. Silva, A. R. Santos, J. Ferreira, M. R. Figuera, and L. F. Royes, "Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach," *Neurotox Res*, vol. 21, pp. 175-84, Feb 2012.
- [9] P. Bernard and G. Ninot, "[Benefits of exercise for people with schizophrenia: A systematic review]," *Encephale*, vol. 38, pp. 280-7, Sep 2012.
- [10] A. Rozanski, "Exercise as medical treatment for depression," *J Am Coll Cardiol*, vol. 60, pp. 1064-6, Sep 18 2012.
- [11] H. Eyre and B. T. Baune, "Neuroimmunological effects of physical exercise in depression," *Brain Behav Immun*, vol. 26, pp. 251-66, Feb 2012.
- [12] K. M. Beavers, T. E. Brinkley, and B. J. Nicklas, "Effect of exercise training on chronic inflammation," *Clin Chim Acta*, vol. 411, pp. 785-93, Jun 3 2010.
- [13] J. L. Teeling, C. Cunningham, T. A. Newman, and V. H. Perry, "The effect of non-steroidal anti-inflammatory agents on behavioural changes and cytokine production following systemic inflammation: Implications for a role of COX-1," *Brain Behav Immun*, vol. 24, pp. 409-19, Mar 2010.
- [14] H. Anisman, Z. Merali, and S. Hayley, "Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders," *Prog Neurobiol*, vol. 85, pp. 1-74, May 2008.
- [15] R. Dantzer, J. C. O'Connor, G. G. Freund, R. W. Johnson, and K. W. Kelley, "From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain," *Nat Rev Neurosci*, vol. 9, pp. 46-56, Jan 2008.
- [16] J. McAfosse and B. T. Baune, "Evidence for a cytokine model of cognitive function," *Neurosci Biobehav Rev*, vol. 33, pp. 355-66, Mar 2009.
- [17] L. E. Rojo, J. A. Fernandez, A. A. Maccioni, J. M. Jimenez, and R. B. Maccioni, "Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease," *Arch Med Res*, vol. 39, pp. 1-16, Jan 2008.
- [18] C. T. Ek Dahl, J. H. Claasen, S. Bonde, Z. Kokaia, and O. Lindvall, "Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, pp. 13632-7, Nov 11 2003.
- [19] M. L. Monje, H. Toda, and T. D. Palmer, "Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis," *Science*, vol. 302, pp. 1760-5, Dec 5 2003.
- [20] A. Semmler, C. Frisch, T. Debeir, M. Ramanathan, T. Okulla, T. Klockgether, and M. T. Heneka, "Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model," *Exp Neurol*, vol. 204, pp. 733-40, Apr 2007.
- [21] A. Semmler, T. Okulla, M. Sastre, L. Dumitrescu-Ozimek, and M. T. Heneka, "Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions," *J Chem Neuroanat*, vol. 30, pp. 144-57, Oct 2005.
- [22] G. A. Czapski, B. Gajkowska, and J. B. Strosznajder, "Systemic administration of lipopolysaccharide induces molecular and morphological alterations in the hippocampus," *Brain Res*, vol. 1356, pp. 85-94, Oct 14 2010.
- [23] C. R. Pugh, K. Kumagawa, M. Fleshner, L. R. Watkins, S. F. Maier, and J. W. Rudy, "Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning," *Brain Behav Immun*, vol. 12, pp. 212-29, Sep 1998.

- [24] K. N. Shaw, S. Commins, and S. M. O'Mara, "Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus," *Behav Brain Res*, vol. 124, pp. 47-54, Sep 28 2001.
- [25] K. Arai, N. Matsuki, Y. Ikegaya, and N. Nishiyama, "Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice," *Jpn J Pharmacol*, vol. 87, pp. 195-201, Nov 2001.
- [26] R. Haba, N. Shintani, Y. Onaka, H. Wang, R. Takenaga, A. Hayata, A. Baba, and H. Hashimoto, "Lipopolysaccharide affects exploratory behaviors toward novel objects by impairing cognition and/or motivation in mice: Possible role of activation of the central amygdala," *Behav Brain Res*, vol. 228, pp. 423-31, Mar 17 2012.
- [27] J. Forshammar, L. Block, C. Lundborg, B. Biber, and E. Hansson, "Naloxone and ouabain in ultralow concentrations restore Na⁺/K⁺-ATPase and cytoskeleton in lipopolysaccharide-treated astrocytes," *J Biol Chem*, vol. 286, pp. 31586-97, Sep 9 2011.
- [28] R. Dringen, "Metabolism and functions of glutathione in brain," *Prog Neurobiol*, vol. 62, pp. 649-71, Dec 2000.
- [29] M. Bergami, S. Santi, E. Formaggio, C. Cagnoli, C. Verderio, R. Blum, B. Berninger, M. Matteoli, and M. Canossa, "Uptake and recycling of pro-BDNF for transmitter-induced secretion by cortical astrocytes," *J Cell Biol*, vol. 183, pp. 213-21, Oct 20 2008.
- [30] R. Donato, G. Sorci, F. Riuzzi, C. Arcuri, R. Bianchi, F. Brozzi, C. Tubaro, and I. Giambanco, "S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1793, pp. 1008-22, Jun 2009.
- [31] C. A. Goncalves, M. C. Leite, and P. Nardin, "Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury," *Clin Biochem*, vol. 41, pp. 755-63, Jul 2008.
- [32] T. Mello e Souza, A. Rohden, M. Meinhardt, C. A. Goncalves, and J. A. Quillfeldt, "S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation," *Physiol Behav*, vol. 71, pp. 29-33, Oct 1-15 2000.
- [33] A. Kleindienst, H. B. Harvey, A. C. Rice, C. Muller, R. J. Hamm, M. R. Gaab, and M. R. Bullock, "Intraventricular infusion of the neurotrophic protein S100B improves cognitive recovery after fluid percussion injury in the rat," *J Neurotrauma*, vol. 21, pp. 541-7, May 2004.
- [34] L. J. Van Eldik and D. B. Zimmer, "Secretion of S-100 from rat C6 glioma cells," *Brain Res*, vol. 436, pp. 367-70, Dec 15 1987.
- [35] A. Suzumura, H. Takeuchi, G. Zhang, R. Kuno, and T. Mizuno, "Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1088, pp. 219-29, Nov 2006.
- [36] T. Mizuno, R. Kuno, A. Nitta, T. Nabeshima, G. Zhang, J. Kawanokuchi, J. Wang, S. Jin, H. Takeuchi, and A. Suzumura, "Protective effects of nicergoline against neuronal cell death induced by activated microglia and astrocytes," *Brain Res*, vol. 1066, pp. 78-85, Dec 20 2005.
- [37] S. O. McGuire, Z. D. Ling, J. W. Lipton, C. E. Sortwell, T. J. Collier, and P. M. Carvey, "Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons," *Exp Neurol*, vol. 169, pp. 219-30, Jun 2001.
- [38] L. Qin, Y. Liu, T. Wang, S. J. Wei, M. L. Block, B. Wilson, B. Liu, and J. S. Hong, "NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia," *J Biol Chem*, vol. 279, pp. 1415-21, Jan 9 2004.
- [39] R. Donato, "Intracellular and extracellular roles of S100 proteins," *Microsc Res Tech*, vol. 60, pp. 540-51, Apr 15 2003.

- [40] P. M. Whitaker-Azmitia, R. Murphy, and E. C. Azmitia, "Stimulation of astroglial 5-HT_{1A} receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology," *Brain Res*, vol. 528, pp. 155-8, Sep 24 1990.
- [41] C. Reali, F. Scintu, R. Pillai, R. Donato, F. Michetti, and V. Sogos, "S100b counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia," *J Neurosci Res*, vol. 81, pp. 677-86, Sep 1 2005.
- [42] N. C. Berchtold, G. Chinn, M. Chou, J. P. Kesslak, and C. W. Cotman, "Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus," *Neuroscience*, vol. 133, pp. 853-61, 2005.
- [43] R. Brines, L. Hoffman-Goetz, and B. K. Pedersen, "Can you exercise to make your immune system fitter?," *Immunol Today*, vol. 17, pp. 252-4, Jun 1996.
- [44] B. K. Pedersen and A. D. Toft, "Effects of exercise on lymphocytes and cytokines," *Br J Sports Med*, vol. 34, pp. 246-51, Aug 2000.
- [45] K. Santin, R. F. da Rocha, F. Cechetti, A. Quincozes-Santos, D. F. de Souza, P. Nardin, L. Rodrigues, M. C. Leite, J. C. Moreira, C. G. Salbego, and C. A. Goncalves, "Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus," *Brain Res*, vol. 1421, pp. 1-10, Nov 3 2011.
- [46] P. N. de Senna, J. Ilha, P. P. Baptista, P. S. do Nascimento, M. C. Leite, M. F. Paim, C. A. Goncalves, M. Achaval, and L. L. Xavier, "Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats," *Metab Brain Dis*, vol. 26, pp. 269-79, Dec 2011.
- [47] L. Rodrigues, M. F. Dutra, J. Ilha, R. Biasibetti, A. Quincozes-Santos, M. C. Leite, S. Marcuzzo, M. Achaval, and C. A. Goncalves, "Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin," *J Neural Transm*, vol. 117, pp. 1295-305, Nov 2010.
- [48] M. F. Dutra, M. Jaeger, J. Ilha, P. I. Kalil-Gaspar, S. Marcuzzo, and M. Achaval, "Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease," *Neurol Sci*, vol. 33, pp. 1137-44, Oct 2012.
- [49] C. Bernardi, A. C. Tramontina, P. Nardin, R. Biasibetti, A. P. Costa, A. F. Vizueti, C. Batassini, L. S. Tortorelli, K. M. Wartchow, M. F. Dutra, L. Bobermin, P. Sesterheim, A. Quincozes-Santos, J. de Souza, and C. A. Goncalves, "Treadmill exercise induces hippocampal astroglial alterations in rats," *Neural Plast*, vol. 2013, p. 709732, 2013.
- [50] E. T. Ang, P. T. Wong, S. Moochhala, and Y. K. Ng, "Cytokine changes in the horizontal diagonal band of Broca in the septum after running and stroke: a correlation to glial activation," *Neuroscience*, vol. 129, pp. 337-47, 2004.
- [51] C. W. Wu, Y. C. Chen, L. Yu, H. I. Chen, C. J. Jen, A. M. Huang, H. J. Tsai, Y. T. Chang, and Y. M. Kuo, "Treadmill exercise counteracts the suppressive effects of peripheral lipopolysaccharide on hippocampal neurogenesis and learning and memory," *J Neurochem*, vol. 103, pp. 2471-81, Dec 2007.
- [52] R. M. Arida, F. A. Scorza, S. Gomes da Silva, R. M. Cysneiros, and E. A. Cavalheiro, "Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents," *Am J Phys Med Rehabil*, vol. 90, pp. 452-65, Jun 2011.
- [53] D. Scopel, C. Fochesatto, H. Cimarosti, M. Rabbo, A. Bello-Klein, C. Salbego, C. A. Netto, and I. R. Siqueira, "Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation," *Brain Res Bull*, vol. 71, pp. 155-9, Dec 11 2006.
- [54] G. A. Lovatel, K. Bertoldi, V. R. Elsner, C. Vanzella, S. Moyses Fdos, C. Spindler, V. R. Funck, L. M. Pereira, C. V. de Oliveira, M. S. Oliveira, C. A. Netto, and I. R. Siqueira, "Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function," *Neurobiol Learn Mem*, vol. 98, pp. 182-7, Sep 2012.

- [55] A. Kelly, E. Vereker, Y. Nolan, M. Brady, C. Barry, C. E. Loscher, K. H. Mills, and M. A. Lynch, "Activation of p38 plays a pivotal role in the inhibitory effect of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta on long term potentiation in rat dentate gyrus," *J Biol Chem*, vol. 278, pp. 19453-62, May 23 2003.
- [56] R. M. Melo, E. Martinho, Jr., and L. C. Michelini, "Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles," *Hypertension*, vol. 42, pp. 851-7, Oct 2003.
- [57] D. C. Rogers, C. A. Campbell, J. L. Stretton, and K. B. Mackay, "Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat," *Stroke*, vol. 28, pp. 2060-5; discussion 2066, Oct 1997.
- [58] R. A. Bevins and J. Besheer, "Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'," *Nat Protoc*, vol. 1, pp. 1306-11, 2006.
- [59] M. Jacewicz, G. A. Czapski, I. Katkowska, and R. P. Strosznajder, "Systemic administration of lipopolysaccharide impairs glutathione redox state and object recognition in male mice. The effect of PARP-1 inhibitor," *Folia Neuropathol*, vol. 47, pp. 321-8, 2009.
- [60] C. B. Netto, S. Conte, M. C. Leite, C. Pires, T. L. Martins, P. Vidal, M. S. Benfato, R. Giugliani, and C. A. Goncalves, "Serum S100B protein is increased in fasting rats," *Arch Med Res*, vol. 37, pp. 683-6, Jul 2006.
- [61] M. C. Leite, F. Galland, G. Brolese, M. C. Guerra, J. W. Bortolotto, R. Freitas, L. M. Almeida, C. Gottfried, and C. A. Goncalves, "A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein," *J Neurosci Methods*, vol. 169, pp. 93-9, Mar 30 2008.
- [62] A. M. Feoli, I. Siqueira, L. M. Almeida, A. C. Tramontina, C. Battu, S. T. Wofchuk, C. Gottfried, M. L. Perry, and C. A. Goncalves, "Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition," *J Nutr*, vol. 136, pp. 2357-61, Sep 2006.
- [63] R. W. Browne and D. Armstrong, "Reduced glutathione and glutathione disulfide," *Methods Mol Biol*, vol. 108, pp. 347-52, 1998.
- [64] L. M. Vieira de Almeida, C. C. Pineiro, M. C. Leite, G. Brolese, R. B. Leal, C. Gottfried, and C. A. Goncalves, "Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide induced toxicity in primary cortical astrocyte cultures," *Neurochem Res*, vol. 33, pp. 8-15, Jan 2008.
- [65] Y. Nolan, E. Vereker, A. M. Lynch, and M. A. Lynch, "Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus," *Exp Neurol*, vol. 184, pp. 794-804, Dec 2003.
- [66] M. G. Dik, C. Jonker, C. E. Hack, J. H. Smit, H. C. Comijs, and P. Eikelenboom, "Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons," *Neurology*, vol. 64, pp. 1371-7, Apr 26 2005.
- [67] C. Holmes, M. El-Okli, A. L. Williams, C. Cunningham, D. Wilcockson, and V. H. Perry, "Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease," *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, vol. 74, pp. 788-9, Jun 2003.
- [68] G. A. Czapski, M. Cakala, M. Chalimoniuk, B. Gajkowska, and J. B. Strosznajder, "Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation," *J Neurosci Res*, vol. 85, pp. 1694-703, Jun 2007.
- [69] G. A. Czapski, M. Cakala, D. Kopczuk, M. Kaminska, and J. B. Strosznajder, "Inhibition of nitric oxide synthase prevents energy failure and oxidative damage evoked in the brain by lipopolysaccharide," *Pol J Pharmacol*, vol. 56, pp. 643-6, Sep-Oct 2004.

- [70] G. A. Czapski, M. Cakala, B. Gajkowska, and J. B. Strosznajder, "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition protects the brain against systemic inflammation," *Neurochem Int*, vol. 49, pp. 751-5, Dec 2006.
- [71] C. J. Henry, Y. Huang, A. Wynne, M. Hanke, J. Himler, M. T. Bailey, J. F. Sheridan, and J. P. Godbout, "Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia," *J Neuroinflammation*, vol. 5, p. 15, 2008.
- [72] R. M. Bluthe, R. Dantzer, and K. W. Kelley, "Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat," *Brain Res*, vol. 573, pp. 318-20, Feb 28 1992.
- [73] T. Tokes, G. Eros, A. Bebes, P. Hartmann, S. Varszegi, G. Varga, J. Kaszaki, K. Gulya, M. Ghyczy, and M. Boros, "Protective effects of a phosphatidylcholine-enriched diet in lipopolysaccharide-induced experimental neuroinflammation in the rat," *Shock*, vol. 36, pp. 458-65, Nov 2011.
- [74] K. Belarbi, T. Jopson, D. Tweedie, C. Arellano, W. Luo, N. H. Greig, and S. Rosi, "TNF-alpha protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation," *J Neuroinflammation*, vol. 9, p. 23, 2012.
- [75] B. Hauss-Wegrzyniak, M. G. Vannucchi, and G. L. Wenk, "Behavioral and ultrastructural changes induced by chronic neuroinflammation in young rats," *Brain Res*, vol. 859, pp. 157-66, Mar 17 2000.
- [76] M. Miwa, M. Tsuboi, Y. Noguchi, A. Enokishima, T. Nabeshima, and M. Hiramatsu, "Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter 2," *J Neuroinflammation*, vol. 8, p. 153, 2011.
- [77] A. Hennigan, C. Trotter, and A. M. Kelly, "Lipopolysaccharide impairs long-term potentiation and recognition memory and increases p75NTR expression in the rat dentate gyrus," *Brain Res*, vol. 1130, pp. 158-66, Jan 26 2007.
- [78] Y. Chen and R. A. Swanson, "Astrocytes and brain injury," *J Cereb Blood Flow Metab*, vol. 23, pp. 137-49, Feb 2003.
- [79] S. Fuller, M. Steele, and G. Munch, "Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease--do they neglect their neurosupportive roles?," *Mutat Res*, vol. 690, pp. 40-9, Aug 7 2010.
- [80] P. L. McGeer and E. G. McGeer, "Inflammation and the degenerative diseases of aging," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1035, pp. 104-16, Dec 2004.
- [81] M. V. Sofroniew, "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation," *Trends Neurosci*, vol. 32, pp. 638-47, Dec 2009.
- [82] R. Aras, A. M. Barron, and C. J. Pike, "Caspase activation contributes to astrogliosis," *Brain Res*, vol. 1450, pp. 102-15, Apr 23 2012.
- [83] M. Eddleston and L. Mucke, "Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease," *Neuroscience*, vol. 54, pp. 15-36, May 1993.
- [84] D. De Filippis, G. Esposito, C. Cirillo, M. Cipriano, B. Y. De Winter, C. Scuderi, G. Sarnelli, R. Cuomo, L. Steardo, J. G. De Man, and T. Iuvone, "Cannabidiol reduces intestinal inflammation through the control of neuroimmune axis," *PLoS One*, vol. 6, p. e28159, 2011.
- [85] M. Rothermundt, M. Peters, J. H. Prehn, and V. Arolt, "S100B in brain damage and neurodegeneration," *Microsc Res Tech*, vol. 60, pp. 614-32, Apr 15 2003.
- [86] F. Tramontina, S. Conte, D. Goncalves, C. Gottfried, L. V. Portela, L. Vinade, C. Salbego, and C. A. Goncalves, "Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats," *Cell Mol Neurobiol*, vol. 22, pp. 373-8, Jun 2002.
- [87] S. S. Yan, Z. Y. Wu, H. P. Zhang, G. Furtado, X. Chen, S. F. Yan, A. M. Schmidt, C. Brown, A. Stern, J. LaFaille, L. Chess, D. M. Stern, and H. Jiang, "Suppression of experimental

- autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system," *Nat Med*, vol. 9, pp. 287-93, Mar 2003.
- [88] W. Pan, C. Yu, H. Hsueh, Y. Zhang, and A. J. Kastin, "Neuroinflammation facilitates LIF entry into brain: role of TNF," *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 294, pp. C1436-42, Jun 2008.
- [89] L. L. Williamson, A. Chao, and S. D. Bilbo, "Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus," *Brain Behav Immun*, vol. 26, pp. 500-10, Mar 2012.
- [90] Y. Tanaka, N. Kawanishi, D. Shiva, N. Tsutsumi, M. Uchida, H. Kitamura, Y. Kato, and H. Yano, "Exhaustive exercise reduces tumor necrosis factor- α production in response to lipopolysaccharide in mice," *Neuroimmunomodulation*, vol. 17, pp. 279-86, 2010.
- [91] G. J. Bagby, D. E. Sawaya, L. D. Crouch, and R. E. Shepherd, "Prior exercise suppresses the plasma tumor necrosis factor response to bacterial lipopolysaccharide," *J Appl Physiol*, vol. 77, pp. 1542-7, Sep 1994.
- [92] H. S. Oliff, N. C. Berchtold, P. Isackson, and C. W. Cotman, "Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus," *Brain Res Mol Brain Res*, vol. 61, pp. 147-53, Oct 30 1998.
- [93] F. Gomez-Pinilla, Z. Ying, R. R. Roy, R. Molteni, and V. R. Edgerton, "Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity," *J Neurophysiol*, vol. 88, pp. 2187-95, Nov 2002.
- [94] Z. Radak, A. Toldy, Z. Szabo, S. Siamilis, C. Nyakas, G. Silye, J. Jakus, and S. Goto, "The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain," *Neurochem Int*, vol. 49, pp. 387-92, Sep 2006.
- [95] F. Cechetti, C. Fochesatto, D. Scopel, P. Nardin, C. A. Goncalves, C. A. Netto, and I. R. Siqueira, "Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus," *Brain Res*, vol. 1188, pp. 182-8, Jan 10 2008.
- [96] F. Cechetti, A. Rhod, F. Simao, K. Santin, C. Salbego, C. A. Netto, and I. R. Siqueira, "Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation," *Brain Res*, vol. 1157, pp. 121-5, Jul 9 2007.
- [97] F. Cechetti, P. V. Worm, V. R. Elsner, K. Bertoldi, E. Sanches, J. Ben, I. R. Siqueira, and C. A. Netto, "Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat," *Neurobiol Learn Mem*, vol. 97, pp. 90-6, Jan 2012.
- [98] S. Elkabes, L. Peng, and I. B. Black, "Lipopolysaccharide differentially regulates microglial trk receptor and neurotrophin expression," *J Neurosci Res*, vol. 54, pp. 117-22, Oct 1 1998.
- [99] T. Miwa, S. Furukawa, K. Nakajima, Y. Furukawa, and S. Kohsaka, "Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia," *J Neurosci Res*, vol. 50, pp. 1023-9, Dec 15 1997.
- [100] Z. Guan and J. Fang, "Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats," *Brain Behav Immun*, vol. 20, pp. 64-71, Jan 2006.
- [101] L. Rodrigues, R. Biasibetti, A. Swarowsky, M. C. Leite, A. Quincozes-Santos, J. A. Quilfeldt, M. Achaval, and C. A. Goncalves, "Hippocampal alterations in rats submitted to streptozotocin-induced dementia model are prevented by aminoguanidine," *J Alzheimers Dis*, vol. 17, pp. 193-202, 2009.
- [102] A. C. Tramontina, K. M. Wartchow, L. Rodrigues, R. Biasibetti, A. Quincozes-Santos, L. Bobermin, F. Tramontina, and C. A. Goncalves, "The neuroprotective effect of two statins: simvastatin and pravastatin on a streptozotocin-induced model of Alzheimer's disease in rats," *J Neural Transm*, vol. 118, pp. 1641-9, Nov 2011.
- [103] E. Vicente, D. Degerone, L. Bohn, F. Scornavaca, A. Pimentel, M. C. Leite, A. Swarowsky, L. Rodrigues, P. Nardin, L. M. de Almeida, C. Gottfried, D. O. Souza, C. A.

- Netto, and C. A. Goncalves, "Astroglial and cognitive effects of chronic cerebral hypoperfusion in the rat," *Brain Res*, vol. 1251, pp. 204-12, Jan 28 2009.
- [104] A. P. Costa, A. C. Tramontina, R. Biasibetti, C. Batassini, M. W. Lopes, K. M. Wartchow, C. Bernardi, L. S. Tortorelli, R. B. Leal, and C. A. Goncalves, "Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia," *Behav Brain Res*, vol. 226, pp. 420-7, Jan 15 2012.
- [105] D. Kligman and D. R. Marshak, "Purification and characterization of a neurite extension factor from bovine brain," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 82, pp. 7136-9, Oct 1985.
- [106] R. H. Selinfreund, S. W. Barger, W. J. Pledger, and L. J. Van Eldik, "Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, pp. 3554-8, May 1 1991.
- [107] D. Kogel, M. Peters, H. G. Konig, S. M. Hashemi, N. T. Bui, V. Arolt, M. Rothermundt, and J. H. Prehn, "S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury," *Neuroscience*, vol. 127, pp. 913-20, 2004.
- [108] F. Tramontina, M. C. Leite, D. Goncalves, A. C. Tramontina, D. F. Souza, J. K. Frizzo, P. Nardin, C. Gottfried, S. T. Wofchuk, and C. A. Goncalves, "High glutamate decreases S100B secretion by a mechanism dependent on the glutamate transporter," *Neurochem Res*, vol. 31, pp. 815-20, Jun 2006.
- [109] A. Kleindienst, M. J. McGinn, H. B. Harvey, R. J. Colello, R. J. Hamm, and M. R. Bullock, "Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury," *J Neurotrauma*, vol. 22, pp. 645-55, Jun 2005.
- [110] J. Hu, F. Castets, J. L. Guevara, and L. J. Van Eldik, "S100 beta stimulates inducible nitric oxide synthase activity and mRNA levels in rat cortical astrocytes," *J Biol Chem*, vol. 271, pp. 2543-7, Feb 2 1996.
- [111] J. Hu, A. Ferreira, and L. J. Van Eldik, "S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes," *J Neurochem*, vol. 69, pp. 2294-301, Dec 1997.
- [112] K. R. Luo, C. J. Hong, Y. J. Liou, S. J. Hou, Y. H. Huang, and S. J. Tsai, "Differential regulation of neurotrophin S100B and BDNF in two rat models of depression," *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, vol. 34, pp. 1433-9, Dec 1 2010.
- [113] A. C. Andreatza, C. Cassini, A. R. Rosa, M. C. Leite, L. M. de Almeida, P. Nardin, A. B. Cunha, K. M. Cereser, A. Santin, C. Gottfried, M. Salvador, F. Kapczinski, and C. A. Goncalves, "Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients," *J Psychiatr Res*, vol. 41, pp. 523-9, Sep 2007.
- [114] E. Vicente, M. Boer, M. Leite, M. Silva, F. Tramontina, L. Porciuncula, C. Dalmaz, and C. A. Goncalves, "Cerebrospinal fluid S100B increases reversibly in neonates of methyl mercury-intoxicated pregnant rats," *Neurotoxicology*, vol. 25, pp. 771-7, Sep 2004.
- [115] M. Herrmann, "High serum S100B levels for trauma patients without head injuries," *Neurosurgery*, vol. 49, pp. 1272-3, Nov 2001.
- [116] U. E. Pleines, M. C. Morganti-Kossmann, M. Rancan, H. Joller, O. Trentz, and T. Kossmann, "S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury," *J Neurotrauma*, vol. 18, pp. 491-8, May 2001.
- [117] H. J. Huttunen, J. Kuja-Panula, G. Sorci, A. L. Agneletti, R. Donato, and H. Rauvala, "Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 40096-105, Dec 22 2000.
- [118] Y. Li, J. Wang, J. G. Sheng, L. Liu, S. W. Barger, R. A. Jones, L. J. Van Eldik, R. E. Mrak, and W. S. Griffin, "S100 beta increases levels of beta-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures," *J Neurochem*, vol. 71, pp. 1421-8, Oct 1998.

- [119] M. Rickmann, J. R. Wolff, and D. L. Meyer, "Expression of S100 protein in the vestibular nuclei during compensation of unilateral labyrinthectomy symptoms," *Brain Res*, vol. 688, pp. 8-14, Aug 7 1995.
- [120] T. Hayakata, T. Shiozaki, O. Tasaki, H. Ikegawa, Y. Inoue, F. Toshiyuki, H. Hosotubo, F. Kieko, T. Yamashita, H. Tanaka, T. Shimazu, and H. Sugimoto, "Changes in CSF S100B and cytokine concentrations in early-phase severe traumatic brain injury," *Shock*, vol. 22, pp. 102-7, Aug 2004.
- [121] T. O. Kleine, L. Benes, and P. Zofel, "Studies of the brain specificity of S100B and neuron-specific enolase (NSE) in blood serum of acute care patients," *Brain Res Bull*, vol. 61, pp. 265-79, Aug 15 2003.
- [122] A. Petzold, R. Jenkins, H. C. Watt, A. J. Green, E. J. Thompson, G. Keir, N. C. Fox, and M. N. Rossor, "Cerebrospinal fluid S100B correlates with brain atrophy in Alzheimer's disease," *Neurosci Lett*, vol. 336, pp. 167-70, Jan 23 2003.
- [123] A. G. Lam, T. Koppal, K. T. Akama, L. Guo, J. M. Craft, B. Samy, J. P. Schavocky, D. M. Watterson, and L. J. Van Eldik, "Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB," *Neurobiol Aging*, vol. 22, pp. 765-72, Sep-Oct 2001.
- [124] A. Kleindienst and M. Ross Bullock, "A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury," *J Neurotrauma*, vol. 23, pp. 1185-200, Aug 2006.
- [125] F. Tramontina, A. C. Tramontina, D. F. Souza, M. C. Leite, C. Gottfried, D. O. Souza, S. T. Wofchuk, and C. A. Goncalves, "Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes," *Cell Mol Neurobiol*, vol. 26, pp. 81-6, Feb 2006.
- [126] N. Ohtaki, W. Kamitani, Y. Watanabe, Y. Hayashi, H. Yanai, K. Ikuta, and K. Tomonaga, "Downregulation of an astrocyte-derived inflammatory protein, S100B, reduces vascular inflammatory responses in brains persistently infected with Borna disease virus," *J Virol*, vol. 81, pp. 5940-8, Jun 2007.
- [127] S. K. Halonen, T. Woods, K. McInerney, and L. M. Weiss, "Microarray analysis of IFN-gamma response genes in astrocytes," *J Neuroimmunol*, vol. 175, pp. 19-30, Jun 2006.
- [128] K. H. Schulpis, M. Moukas, T. Parthimos, T. Tsakiris, N. Parthimos, and S. Tsakiris, "The effect of alpha-Tocopherol supplementation on training-induced elevation of S100B protein in sera of basketball players," *Clin Biochem*, vol. 40, pp. 900-6, Aug 2007.
- [129] M. O. Dietrich, A. B. Tort, D. V. Schaf, M. Farina, C. A. Goncalves, D. O. Souza, and L. V. Portela, "Increase in serum S100B protein level after a swimming race," *Can J Appl Physiol*, vol. 28, pp. 710-6, Oct 2003.
- [130] M. Otto, S. Holthusen, E. Bahn, N. Sohnchen, J. Wiltfang, R. Geese, A. Fischer, and C. D. Reimers, "Boxing and running lead to a rise in serum levels of S-100B protein," *Int J Sports Med*, vol. 21, pp. 551-5, Nov 2000.
- [131] M. Hasselblatt, F. C. Mooren, N. von Ahsen, K. Keyvani, A. Fromme, K. Schwarze-Eicker, V. Senner, and W. Paulus, "Serum S100beta increases in marathon runners reflect extracranial release rather than glial damage," *Neurology*, vol. 62, pp. 1634-6, May 11 2004.
- [132] B. M. Stalnacke, Y. Tegner, and P. Sojka, "Playing soccer increases serum concentrations of the biochemical markers of brain damage S-100B and neuron-specific enolase in elite players: a pilot study," *Brain Inj*, vol. 18, pp. 899-909, Sep 2004.
- [133] B. M. Stalnacke, Y. Tegner, and P. Sojka, "Playing ice hockey and basketball increases serum levels of S-100B in elite players: a pilot study," *Clin J Sport Med*, vol. 13, pp. 292-302, Sep 2003.
- [134] C. Woertgen, R. D. Rothoerl, K. Sauer, and A. Brawanski, "Does bungee jumping release S-100B protein?," *J Clin Neurosci*, vol. 9, pp. 51-2, Jan 2002.
- [135] O. Dietrich Mde, D. O. Souza, and L. V. Portela, "Serum S100B protein: what does it mean during exercise?," *Clin J Sport Med*, vol. 14, pp. 368; author reply 368-9, Nov 2004.

- [136] C. A. Goncalves, M. C. Leite, and M. C. Guerra, "Adipocytes as an Important Source of Serum S100B and Possible Roles of This Protein in Adipose Tissue," *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, vol. 2010, p. 790431, 2010.
- [137] C. W. Cotman and N. C. Berchtold, "Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity," *Trends Neurosci*, vol. 25, pp. 295-301, Jun 2002.
- [138] C. W. Cotman, N. C. Berchtold, and L. A. Christie, "Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation," *Trends Neurosci*, vol. 30, pp. 464-72, Sep 2007.

Figure legends

Fig. 1. Schematic representation of the experimental protocol. Three days of acclimatization to the treadmill; two weeks of moderate treadmill exercise (20min/day at 60% exercise maximal capacity); 24 hours before LPS administration, the rats were submitted of the Rota-rod task; systemic-LPS administration (1mg/kg body weight; i.p.); six hours after the LPS injection, the rats were submitted to the Rota-rod test; 24 hours and 48 hours after the LPS administration the rats were tested in the short-term and long-term object recognition task, respectively; 24 hours after the long-term cognitive task, cerebrospinal fluid, serum and hippocampi were harvested for biochemical evaluation.

Fig. 2. LPS causes increase in body temperature in rats submitted to treadmill running (20min/day during 2 weeks) and systemic-LPS administration (1mg/kg body weight, i.p.). Body temperature was measured 6 hours after LPS injection, using a clinical digital infrared ear thermometer (model IR1DB1, G.TECH[®]). Values are means \pm standard error. * Significantly different from SED+SAL and EXE+SAL groups (N = 7–10), two-way ANOVA, followed by Tukey's test, $p < 0.05$).

Fig. 3. LPS and exercise appears to impair Rota-Rod performance of rats submitted to treadmill exercise (20min/day, 2 weeks) and systemic-LPS administration (1mg/kg body weight; i.p.). Differences in mean motor performance between all groups were determined at 6 hours after the LPS injection. * Significantly different from EXE+SAL group. # Significantly different from all other groups. (N = 8–9, two-way ANOVA, followed by Tukey's test, $p < 0.05$).

Fig. 4. LPS and physical exercise has no effect on object recognition behaviors. Short (panel A) and long-term (panel B) object recognition behaviors of rats submitted to treadmill running (20min/day, 2 weeks) and systemic-LPS administration (1mg/kg body weight; i.p.). Results are expressed by the discrimination ratio (novel object interaction/total interaction with both objects). A positive discrimination ratio is above 0.5. Values are means \pm standard error of 10 rats in each group.

Fig. 5. LPS increases the TNF- α content, but neither LPS nor exercise has any effect on BDNF content in the hippocampus. TNF- α and BDNF content in the hippocampus of rats submitted to treadmill exercise (20min/day; 2 weeks) and acute LPS administration (1mg/kg body weight; i.p.). Hippocampi were dissected out and the TNF- α (panel A) and BDNF (panel B) were measured by ELISA at 3 days after LPS injection. Values are mean \pm standard error of 9–10 rats in each group. *Significantly different from the SED+SAL group (two-way ANOVA, followed by Tukey's test, $p < 0.01$).

Fig. 6. LPS and exercise has no effect on S100B content and GS activity in the hippocampus. S100B content and GS activity in the hippocampus of rats submitted to treadmill exercise (20min/day; 2 weeks) and systemic-LPS administration (1mg/kg body weight; i.p.). Three days after the LPS injection, hippocampi were dissected out and homogenized for measurement of S100B content (in panel A) or GS activity (in panel B). Values are means \pm standard error. (N = 9–10, two-way ANOVA, followed by Tukey's test, $p < 0.05$).

Fig. 7. LPS and exercise has no effect on GSH and ROS levels in the hippocampus. GSH and Reactive Oxygen Species levels in the hippocampus of rats submitted to treadmill exercise (20min/day; 2 weeks) and systemic-LPS administration (1mg/kg body weight; i.p.). Three days after the LPS injection, hippocampi were dissected out and homogenized for measurement of ROS (in panel A) or GSH (in panel B). Values are means \pm standard error. (N= 9–10, two-way ANOVA, followed by Tukey's test, $p < 0.05$).

Fig. 8. LPS and physical exercise affects S100B levels in the CSF and serum of rats. S100B levels in the cerebrospinal fluid (CSF) and serum of rats submitted to treadmill

exercise (20min/day; 2 weeks) and systemic-LPS administration (1mg/kg body weight; i.p.). Three days after the LPS injection, cerebrospinal fluid (in panel A) was collected by cisterna magna puncture. Serum (in panel B) was collected by intracardiac puncture. S100B levels were measured by ELISA. * Significantly different from SED+SAL and SED+LPS groups. # Significantly different from EXE+SAL group. Values are mean \pm standard error of 7–10 rats in each group (two-way ANOVA, followed by Tukey's test, $p < 0.05$).

ARTIGO 4

*Effect of dance on functional independence, emotional state
and biochemical parameters glial, metabolic and immunological
of individuals with chronic spinal cord injury*

Em preparação.

(A introdução e discussão deste artigo estão contidas no capítulo 1 e 3 desta tese)

METHODS

Participants

Our study included twenty five patients with SCI, men, hospitalized at the Julio Diaz Rehabilitation Hospital (Havana, Cuba) between June and August 2012. Patient's average age \pm standard deviation (SD) was 46.4 ± 12.8 years and in all cases the spinal cord injury was acquired. Subject characteristics are reported in table 1. The following selection criteria were used: (1) patients should have at least one year of injury; (2) patients should be sedentary; (3) none was suffering from major medical problems like diabetes, cardiovascular disease or infections; (4) subjects should be voluntary and they should signing the informed consent. Their education background was as follows: 36% had primary school education only; 40% had completed high school and 24% had university. The median time of injury was 4.8 years. Twenty four percent of patients had complete ASIA class A injuries, 4% has ASIA class B, 28% had ASIA class C, and 44% had ASIA class D. On average, attendance at the dance program was 85%. Before and during the study subjects were on an *ad libitum* diet. The protocol was approved by the Research Committee at Julio Diaz Rehabilitation Hospital. Informed consent was obtained from each patient.

Evaluation of patient and application of the scales

Measures were collected during the week prior to the dance program and again during the week following the program. Participants were tested on their typical regimen of medication(s) at the same time of day. The patients were classified according to ASIA. This classification was obtained by analyzing the medical records of the patient. After it was completed a plug anamnesis; during this evaluation, we also sought to determine the presence of risk factors, concomitant diseases, or limitations to perform the program dance. The Functional Independence Measure (FIM™), Barthel Index, Berg Balance Scale and Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) were used to evaluate each patient. During post-testing, participants were asked if they perceived improvements following the dance program and if your feelings of well-being had been affected by dance.

Biochemical analysis

These tests were repeated at the end of the study.

Lipid profiles and fasting glucose - The blood samples were drawn to determine serum lipid profiles. The blood collection from all subjects for biochemical analysis was performed at the clinical laboratory of Julio Diaz Rehabilitation Hospital. The recommended 12 hours of fasting was followed. The biochemical analyzes of fasting glucose (GLU), triglyceride (TRI), total cholesterol (TC) were performed in triplicate, considering the average between them. For determination of glucose the method used was the oxidase enzymatic colorimetric. For the CT and TRI was applied the enzymatic colorimetric method. The blood collection for the final evaluation was performed 24 hours after the last dance class.

Cortisol analysis - The cortisol (CORT) was determined using the CORTISOL [¹²⁵I] RIA KIT (Ref: RK-240CT) (Izotóp, Hungary), according to the manufacturer's recommendations.

Quantification of S100B and GFAP - S100B content in the serum was measured by ELISA (Leite et al., 2008). Briefly, 100 µL of sample were incubated for 2 h on a microtiter plate previously coated with monoclonal anti- S100B (SH-B1). Polyclonal anti-S100B was incubated for 30 min and then peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was added for a further 30 min. A colorimetric reaction with o-phenylenediamine was measured at 492 nm. The standard S100B curve ranged from 0.019 to 10 ng/mL. ELISA for GFAP (Tramontina et al., 2007) was carried out by coating the microtiter plate with 100 µL for overnight at 4 °C. Incubation with a rabbit polyclonal anti-GFAP for 2 h was followed by incubation with a secondary antibody conjugated with peroxidase for 1 h, at room temperature; the standard GFAP curve ranged from 0.1 to 10 ng/mL.

BDNF concentration - BDNF protein was assessed using the ChemiKine™ Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Sandwich ELISA kit (Millipore, USA), according to the manufacturer's recommendations.

C-reactive protein measurement

C-reactive protein was assessed using the PCR Ultrasensível Turbitest AA (Weiner lab, Argentina), and was performed for Clinical Analysis Laboratory of the Faculty of Pharmacy of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Brazil).

Dance Program

The dance program was conducted for 4 weeks; the classes has duration of 1.5 hours and frequency of 5 times per week. A professional dance instructor led the program. Besides the participants with spinal cord injuries, participated in dance classes some caregivers, with the goal of encouraging socialization. Activities progressed in difficulty throughout the dance program and focused on balance strategies, weight-sharing, fall management, and spatial awareness using a variety of contact and non-contact partnered improvisation techniques. Mobility activities, strength, coordination, recreation, and relaxation were combined. Dances were performed in three different ways: (1) individually, (2) in pairs, (3) and with the whole group. Partners exchanged frequently throughout the class. In the mat activities aimed to the work of body perception, weight transfer, relaxation, rolling, stretching and sensory stimulation. The music repertoire used in the classes was selecting by the participants and includes a variety of music types.

Data Analysis

The nonparametric Wilcoxon signed-rank test was used to compare the numeric variables obtained during the dance intervention. Pearson correlation was used. We considered p less than .05 statistically significant. IBM SPSS Statistic 20 was used for data processing.

RESULTS

FIM, BARTHEL and BERG instruments

Dance produced a significant increased in FIM ($p < 0.01$) and BARTHEL ($p < 0.001$) scores, comparing with the initial evaluation. The results demonstrated a improve in the BERG values at the end of dance class ($p < 0.00$). Moreover, the Pearson correlation was positive for the BERG values and the ASIA classification, in the initial ($p = 0.00$) and final ($p = 0.00$) evaluation. When we analysed the ASIA groups

separately, the ASIA A shown increase in the Berg ($p < 0.03$) scale, while the ASIA C group demonstrated improve in the Berg ($p < 0.02$) and Barthel ($p < 0.04$) scales. The scores of ASIA D group presents change in the Berg scale ($p < 0.01$) after the dance practice. These results suggest that the dance improves the functional capacity and balance in individuals with spinal cord injury (**table 2**).

Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)

Four weeks of practice of dance demonstrated decreased the stress and depression symptoms in persons with spinal cord injury ($p < 0.00$) (**table 2**). When we analysed the ASIA groups separately, the ASIA A, C e D groups shown decrease HADS.

Biochemical Parameters

The levels of cholesterol, triglycerides and fasting glucose did not change with dance practice (table 3). The glial parameters, S100B and GFAP also did not present significant alterations after the dance program, and the same result was meet in the CORT and PCR parameters (**table 3**). However, the BDNF levels in the serum of person with spinal cord injury demonstrated a significant increased with the dance intervention ($p < 0.01$).

Table 1. Subject Characteristics

Patient	Age (year)	Neurologic classification	Injury level	Time with injury (year)	Etiology
1	37	A	D5	2	Automobile accident
2	28	A	D8	2	Fall of height
3	29	A	L3	2	Herniated disc
4	23	A	D10	13	firearm
5	52	A	L1	9	Transverse myelitis
6	37	A	C6	1	Work accident
7	32	B	C6	1,3	Fall of height
8	51	C	D11	9	Herniated disc
9	46	C	L3	1,5	Fall of height
10	48	C	C4	2	Domestic accident
11	48	C	C4	8	firearm
12	63	C	C3	3,5	Herniated disc
13	57	C	D12	2	Motorcicle accident
14	59	C	D3	1,5	Spinal cord tumor
15	45	D	D11	3	non-Hodgkin lymphoma
16	30	D	D7	4	injury by cutting weapon
17	42	D	C5	21	Diving accident
18	46	D	C4	1	Herniated disc
19	46	D	C4	1	Fall of height
20	40	D	D4	6	Injury by cutting weapon
21	46	D	L1	6	Herniated disc
22	64	D	C8	8	Herniated disc
23	53	D	D12	1	Herniated disc
24	68	D	L2	7	spondylotic myelopathy
25	70	D	L2	5	Fall of height

Table 2. Results of Behavioral Scales before and after Dance

Scales	Initial	Final	<i>p</i>
FIM	111.25 ± 17.07	113.42 ± 17.36	0.017
BARTHEL	80.22 ± 22.79	86.3 ± 21.86	0.001
BERG	21.78 ± 17.9	29.46 ± 21.38	0.000
HADS	6.71 ± 4.72	2.04 ± 3.83	0.000

NOTE. Data are mean ± SD

Table 3. Results of Biochemical Parameters before and after Dance

Scales	Initial	Final	<i>p</i>
COL (mg/dL)	4.49 ± 1.06	4.71 ± 0.97	0.18
TRI (mg/dL)	1.42 ± 0.74	1.5 ± 0.61	0.1
GLU (mg/dL)	4.9 ± 0.51	4.98 ± 0.62	0.4
CORT (nMol/L)	334.6 ± 105.89	280.65 ± 103.75	0.08
BDNF (pg/μg prot)	0.21 ± 0.08	0.23 ± 0.08	0.01*
GFAP (ng/μg prot)	0.05 ± 0.03	0.09 ± 0.06	0.17
PCR (mg/L)	8.84 ± 11.3	10.12 ± 13.07	0.92

* *p* < 0.05

CAPITULO III

Discussão geral

3.1 Efeito do exercício físico (forçado e voluntário) sobre os astrócitos no SNC intacto: o papel da corticosterona e do BDNF

Mais de 90% das células do SNC parecem ser do tipo glial e, então, é difícil imaginar que os efeitos benéficos da atividade física não podem, ao menos parcialmente, envolver tipos celulares gliais (Nithianantharajah and Hannan, 2009). Há evidências de que o enriquecimento ambiental (que inclui atividade física) pode alterar o número de células gliais em regiões encefálicas específicas (Ehninger and Kempermann, 2003; Komitova et al., 2006; Kronenberg et al., 2007; Viola et al., 2009; Ziv et al., 2006) e de que o exercício físico tem efeito sobre os astrócitos no SNC (de Senna et al., 2011; Rodrigues et al., 2010; Santin et al., 2011). Pesquisas sobre os efeitos não neurais do exercício físico são interessantes à luz de novas evidências de que células com propriedades imunológicas, incluindo a microglia e os astrócitos, têm um importante papel na modulação da neurogênese e aprendizagem (Choi et al., 2008; Gibbs et al., 2008; Ziv et al., 2006). Além disso, é sabido que sinapses podem ser tripartite, consistindo em componentes pré sinápticos, pós-sinápticos e gliais. Então, a plasticidade glial induzida pelo exercício físico pode ter importantes consequências funcionais neste sistema. Com o objetivo de investigar os efeitos do exercício forçado e voluntário sobre os astrócitos, as duas primeiras pesquisas desta tese foram realizadas. Os resultados obtidos a partir dos artigos 1 e 2 (**tabela 4**) mostraram que os exercícios forçado e voluntário, no SNC intacto, modulam diferentemente as células astrocíticas.

Cabe ressaltar que os dois protocolos de exercício foram aplicados durante 4 semanas e que a frequência foi de 5 dias por semana. As diferenças nestes protocolos são inerentes à atividade forçada e voluntária onde a primeira teve seus parâmetros impostos pelo pesquisador (20 minutos por dia e velocidade de acordo com a capacidade de exercício máxima dos animais; $V_m = 2,1$ km/h) e a segunda foi

dependente da motivação dos animais (média de 1 hora de corrida à velocidade média de 3 km/h).

Tabela 4. Resumo dos resultados dos artigos 1 e 2.

Parâmetros analisados	Exercício Forçado	Exercício Voluntário
GFAP	diminuiu	não alterou
Glutamina sintetase (GS)	aumentou	aumentou
Óxido nítrico (NO)	diminuiu	não foi analisado
BDNF	não alterou	aumentou
S100B	não alterou	não alterou

Os resultados mostram que 4 semanas de exercício moderado em esteira (**ARTIGO 1**) diminuiu o conteúdo de GFAP no hipocampo dos animais. Este achado está de acordo com a diminuição no número e imunoreatividade das células à GFAP no córtex cerebral de ratos observado após a corrida em esteira (Ang et al., 2004). Contudo, não há consenso na literatura em relação aos efeitos do exercício físico sobre a expressão de GFAP nos astrócitos. Estudos mostraram que o exercício aumentou a expressão de GFAP em diferentes regiões cerebrais tais como córtex cerebral, estriado (Li et al., 2005) e hipocampo (Rodrigues et al., 2010). Outras pesquisas não encontraram alterações nestes parâmetros no hipocampo (de Senna et al., 2011; Santin et al., 2011). Esta discrepância nos resultados pode ter origem nas diferenças metodológicas, incluindo regiões cerebrais, protocolo de exercício (frequência e intensidade), e duração do treinamento (Cotman et al., 2007). Além disso, não se pode descartar a hipótese de que as mudanças observadas no hipocampo (na GFAP e em outros parâmetros) refletem diferenças entre os ratos, com base em diferenças inerentes, ou seja, os ratos que ansiosamente se exercitaram versus os ratos que se recusaram a correr durante a execução do teste inicial. Contudo, os níveis de lactato sanguíneo mensurados previamente ao teste não mostraram alteração (dados não mostrados). O lactato é um importante substrato energético para o SNC e tem sido proposto que um aumento nos níveis de lactato sanguíneo, durante a atividade física, pode induzir mudanças encefálicas (van Hall et al., 2009). Interessantemente, nós encontramos uma diminuição nos níveis de lactato no soro com nosso protocolo de exercício. Esta aparente diminuição paradoxal também tem sido descrita em camundongos submetidos a 6 semanas de exercício em esteira de intensidade moderada (E et al., 2013). Esta

diminuição pode ser interpretada como uma adaptação ao exercício, em particular com uma melhora no Ciclo de Cori (entre o músculo e o fígado). Suportando esta ideia, um estudo encontrou um aumento no transportador de lactato no fígado. Portanto, parece que o lactato não está mediando as mudanças observadas no hipocampo em nosso estudo. Contudo, não podemos excluir a possibilidade de um aumento no lactato sanguíneo no início do protocolo de exercício, levando a mudanças hipocâmpais.

A GFAP é uma proteína altamente regulada, cuja expressão é induzida pelo desenvolvimento encefálico e lesão (Eng et al., 2000). Nós observamos uma diminuição na GFAP hipocâmpal, induzida pelo exercício em esteira ergométrica. Até o momento, nossa hipótese de trabalho é que a corticosterona, cujos níveis sorológicos encontraram-se aumentados em nosso protocolo de exercício, pode regular negativamente a expressão de GFAP. De fato, os níveis de GFAP são negativamente regulados por glicocorticoides no hipocampo de ratos [ver (Nichols et al., 2005) para uma revisão]. Ademais, nós podemos especular que esta regulação negativa da GFAP (induzida pelo exercício) pode estar associada com outras mudanças neuronais que acompanham as condições de regulação negativa da GFAP, tais como o crescimento de neuritos (Menet et al., 2001; Rozovsky et al., 2002). Assim, nós podemos sugerir que a diminuição da GFAP é um sinal indireto de plasticidade neuronal no hipocampo de ratos em resposta ao exercício em esteira. Estudos tem sugerido que a expressão de GFAP tem um importante papel na interação neurônio-astrocítico (Tanaka et al., 2002); todavia, a consequência desta mudança nos processos cognitivos permanece sem esclarecimento.

Ao contrário da GFAP, a S100B não foi modificada pelo exercício forçado no hipocampo de ratos, confirmando relatos anteriores (de Senna et al., 2011; Santin et al., 2011). Esta proteína é secretada pelos astrócitos e tem um efeito trófico extracelular sobre os neurônios e células gliais (Donato and Heizmann, 2010; Goncalves et al., 2008). Ademais, neste estudo não foram observadas mudanças na secreção basal *in vitro* desta proteína em fatias hipocâmpais, em concordância com os níveis inalterados de S100B no líquido cefalorraquidiano em ratos submetidos ao exercício em esteira (Rodrigues et al., 2010).

O BDNF é uma neurotrofina, associada com a plasticidade cerebral, que é induzida pelo exercício físico (Cotman and Berchtold, 2002; Ma, 2008; Rasmussen et al., 2009). Esta neurotrofina não tem efeito sobre a expressão de GFAP na retina (Chen and Weber, 2002), mas foi capaz de reduzir a expressão de GFAP no córtex cerebral após uma isquemia (Schabitz et al., 2004). Por outro lado, o BDNF foi capaz de

restaurar os níveis reduzidos de GFAP hipocampal produzidos por um estresse crônico leve imprevisível em ratos (Ye et al., 2011). Sob estas condições, nós não observamos mudanças significativas induzidas pelo exercício físico sobre o BDNF que possa ser relacionada à diminuição nos níveis de GFAP.

A corticosterona é capaz de transitoriamente regular negativamente o RNA mensageiro do BDNF no hipocampo (Soya et al., 2007), possivelmente contribuindo, neste estudo, para manter os níveis desta neurotrofina inalterados. Além disso, outros estudos usando exercício físico agudo moderado (por 1 hora) (Goekint et al., 2011) ou por 2 semanas (Cechetti et al., 2008; Ferreira et al., 2011) também não encontraram mudanças no BDNF hipocampal.

Além da diminuição na GFAP, nós encontramos um aumento na atividade da GS. Se este efeito também depende da corticosterona permanece obscuro, mas tem sido referido que a expressão de GFAP e GS *in vivo* mostram respostas opostas à corticosterona no hipocampo (Laping et al., 1994). Porém, não há informações suficientes sobre mudanças nestas proteínas induzidas pelo exercício. Recentemente, nós encontramos que a atividade da GS foi aumentada pela restrição calórica, mas não pelo exercício físico (corrida em esteira, sessões de 20 minutos, por 12 semanas). Isto pode sugerir que o aumento da GS induzido por 4 semanas de protocolo de corrida em esteira pode ser transitório (bem como a diminuição de GFAP). Este aumento na atividade da GS induzida pelo exercício físico pode ser benéfico para o encéfalo, uma vez que esta enzima é envolvida na modulação da reciclagem do glutamato através do ciclo glutamato-glutamina e detoxificação da amônia, e que sua diminuição tem sido observada em desordens neurodegenerativas (Robinson, 2001). A atividade desta enzima é negativamente modulada pela nitração no resíduo de tirosina, através da via de transdução do sinal NO-GMPc mediado pelo receptor NMDA [ver Butterworth (2010) para uma revisão]. É importante observar que, enquanto o NO (óxido nítrico) trabalha como um mediador fisiológico, a excessiva liberação de NO devido à elevada expressão de NO sintase induzível (*inducible-synthase nitric oxide*, iNOS) medeia as doenças degenerativas/inflamatórias do SNC (Brown, 2007). Neste trabalho nós observamos uma diminuição no conteúdo de NO (mensurado através do conteúdo de nitrito), que por sua vez pode ser conectada à diminuição da atividade da GS. Em concordância com estes achados, o exercício físico foi capaz de prevenir o aumento no conteúdo de NO hipocampal induzido pela administração intracerebroventricular de estreptozotocina (Rodrigues et al., 2010). O mecanismo para isto permanece não esclarecido, mas ele

pode também ser mediado pela corticosterona. Em apoio à esta hipótese, o exercício de natação induziu uma diminuição na iNOS hipocampal de ratos, possivelmente dependente da corticosterona (Liu et al., 2010). Outra evidência experimental reforçou a importância do exercício em esteira para a diminuição da iNOS em modelos de murídeos de doenças neurodegenerativas, tais como Doença de Parkinson (Sung et al., 2012) e Doença de Alzheimer (Leem et al., 2011).

Considerando a estreita relação metabólica entre glutamina e glutamato, nós também investigamos a captação de glutamato em fatias hipocampais de ratos exercitados. Não foram observadas mudanças na captação de glutamato, em concordância com outros estudos prévios usando um protocolo de exercício de maior duração (Santin et al., 2011). O conteúdo de GSH e Espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*, ROS) (dados não mostrados) não foram alterados pelo exercício físico sob nossas condições. Uma diminuição da GSH pode sugerir estresse oxidativo, e um aumento induzido pelo exercício físico tem sido interpretado como um sinal de melhora nas defesas antioxidantes (Rodrigues et al., 2010; Santin et al., 2011). Um elegante estudo mostrou que a corrida moderada em esteira não mudou o conteúdo basal de GSH, mas foi capaz de reverter esta diminuição da GSH induzida pela administração intraperitoneal de butionina sulfoximina (Salim et al., 2010). Outro importante aspecto para a atividade encefálica, durante o exercício físico, é o aumento do fluxo sanguíneo encefálico que é comumente relacionado à captação de substrato energético (Querido and Sheel, 2007). Por exemplo, pacientes com diabetes tipo 2 podem beneficiar-se do exercício físico, já que os músculos aumentam dramaticamente a captação de glicose (Goodwin, 2010). Entretanto, as alterações encefálicas induzidas pelas alterações físicas não tem sido avaliadas e potenciais mudanças no hipometabolismo que precede as doenças neurodegenerativas [ver Cunnane et al. (2011)] podem ser muito utilizadas para melhora da qualidade de vida. Neste estudo, nenhuma mudança foi observada na captação de glicose nas fatias hipocampais de animais saudáveis exercitados (dados não mostrados). Contudo, este parâmetro deve ser investigado em modelos de doenças encefálicas, onde o exercício físico tem sido proposto como uma estratégia neuroprotetora (Rodrigues et al., 2010).

Assim como no protocolo de exercício em esteira, nosso protocolo de exercício voluntário em roda de correr (**ARTIGO 2**) demonstrou aumento da atividade da enzima GS no hipocampo de ratos exercitados. Por outro lado, diferentemente do exercício forçado, este paradigma mostrou ser capaz de induzir aumento no conteúdo de BDNF

hipocampal. Estes resultados indicam que os exercícios forçado e voluntário parecem não ser equivalentes em relação aos seus efeitos sobre os astrócitos no SNC e possivelmente não devam ser utilizados de forma intercambiável para estudar os efeitos do exercício físico sobre o SNC e comportamento.

Este estudo investigou o conteúdo de GFAP sobre o hipocampo de ratos adultos após 4 semanas de livre acesso às rodas de correr (12 horas durante o ciclo escuro) e não encontrou alterações neste parâmetro. Inversamente, Muller et al. (2011) encontrou um aumento no número de células hipocampais positivas para GFAP de animais que exercitaram-se voluntariamente. Outro estudo mostrou que o exercício em rodas de correr, mas não o enriquecimento ambiental, fortemente induziu astrogênese no hipocampo de camundongos. Por outro lado, Iadecola and Nedergaard (2007) examinaram o efeito do exercício voluntário sobre os astrócitos no hipocampo e mostraram uma significativa redução de 30% na imuno-marcação para GFAP nos ratos do grupo exercício comparados com os controles. Existem poucas pesquisas sobre astrócitos e exercício físico e este número é ainda mais reduzido quando se refere ao exercício voluntário, o que dificulta a análise dos resultados obtidos nas diversas pesquisas. As diferenças encontradas entre os estudos previamente mencionados podem ser explicadas pelas diferentes áreas encefálicas investigadas, anticorpos e técnicas utilizadas e espécie de animal utilizados (ratos ou camundongos). Além disso, é importante ressaltar a heterogeneidade dos astrócitos. Estes estudos podem ter analisado diferentes subgrupos de astrócitos dentro de uma mesma região estudada.

No tecido encefálico saudável, a GS é expressa exclusivamente em astrócitos, onde ela converte o glutamato captado em glutamina (Kosenko et al., 2003; Suarez et al., 2002; Vardimon, 2000; Zou et al., 2010). A expressão de GS é um marcador de diferenciação e maturação nos astrócitos saudáveis (Caldani et al., 1982; Patel et al., 1982), porém, em estados patológicos, as mudanças na expressão da GS estão envolvidas com a astrocitose reativa (Zou et al., 2011). Até este momento, nosso laboratório foi o único que investigou os efeitos do exercício crônico sobre esteira ergométrica ou roda de correr sobre a atividade da GS no hipocampo (Santin et al., 2011). Nossa investigação sobre as mudanças na atividade da GS após 4 semanas de exposição dos ratos às rodas de correr (durante 12 horas no ciclo escuro), mostrou que a atividade da GS é aumentada no hipocampo destes animais cronicamente exercitados. Estudos tem mostrado que a atividade da GS declina com o envelhecimento e que a esta atividade está substancialmente diminuída no córtex cerebral de pacientes com Doença

de Alzheimer quando comparados com seus controles (Hensley et al., 1995; Smith et al., 1991). Um trabalho mostrou que a quantidade da proteína GS no cérebro de pacientes com DA é inversamente correlacionada com o número de placas beta-amilóides (Le Prince et al., 1995). Então, podemos sugerir que o aumento da atividade da GS promovido pelos exercícios forçado e voluntário, crônicos, pode ser um dos mecanismos através dos quais o exercício físico melhora a cognição e diminui o número de placas beta-amilóides em pacientes com Doença de Alzheimer e modelos animais de demência, bem como em animais e humanos idosos. Contudo, mais estudos são necessários para investigar esta hipótese e conhecer os mecanismos através dos quais o exercício físico atua sobre a GS e demais parâmetros astrocíticos.

Nosso resultado em relação à captação de glutamato em fatias hipocampais demonstrou que tanto o exercício forçado quanto o voluntário não tiveram efeitos sobre este parâmetro. O glutamato captado pelos astrócitos pode ser convertido em glutamina no ciclo glutamato-glutamina, através da GS, ou entra como alfacetoglutarato no ciclo de Krebs nos astrócitos (Gonzalez and Salido, 2009). Nós sugerimos que em nosso modelo de exercício voluntário, onde foi mostrado aumento da GS sem qualquer mudança na captação de glutamato, o glutamato captado pelos astrócitos é preferencialmente usado para produção de glutamina e consequente reciclagem do glutamato e GABA nos neurônios. Outro estudo que investigou o efeito da corrida voluntária sobre a captação de glutamato no hipocampo, ao contrário do nosso resultado, encontrou um aumento na captação de glutamato no grupo exercitado em relação aos camundongos sedentários (Muller et al., 2011).

Em nossa pesquisa, os ratos submetidos ao exercício em rodas de correr não apresentaram mudanças nos níveis de GSH hipocampal. De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que avalia o efeito do exercício voluntário sobre os níveis de GSH no hipocampo. O modelo de exercício voluntário utilizado neste estudo também não promoveu alteração na captação de glicose em fatias hipocampais. Porém, um estudo que avaliou a influência do exercício sobre a oxidação da glicose após 4 semanas de acesso à corrida voluntária mostrou um aumento da oxidação da [U-14C] glicose nas fatias hipocampais de camundongos exercitados em relação aos controles. Allen and Messier (2012) mostraram que o acesso a roda de correr por 48 horas induziu a expressão de GLUT 1 no córtex motor de camundongos mas não no hipocampo. A marcação do GLUT 1 sugere que os pés terminais vasculares dos astrócitos aumentam de tamanho em regiões motoras e que há um aumento no

suprimento energético após a experiência de treinamento. Como descrito anteriormente, existem poucos trabalhos na literatura sobre os efeitos do exercício sobre a captação de glicose no hipocampo e os achados relatados sobre este parâmetro são conflitantes. Esta divergência pode ser explicada, ao menos em parte, pelos distintos métodos utilizados, estruturas cerebrais analisadas, diferenças no protocolo de exercício (frequência, duração, intensidade) e animais utilizados (ratos ou camundongos).

Além disso, poucos estudos analisaram o efeito do exercício sobre o conteúdo de S100B em animais submetidos ao exercício voluntário. Em humanos, aumento nos níveis sorológicos de S100B foram observados em diferentes tipos de exercício físico (Cheuvront et al., 2008; Dietrich et al., 2003; Hasselblatt et al., 2004; Otto et al., 2000; Schulpis et al., 2007; Stalnacke et al., 2003; Stalnacke et al., 2004). Nosso estudo não encontrou diferença significativa no conteúdo de S100B hipocampal de ratos que foram submetidos ao exercício em rodas de correr (dados não mostrados). Podemos sugerir que, em situação de saúde, o exercício voluntário parece não exercer efeito sobre este parâmetro em animais. O aumento dos níveis de S100B no soro de humanos após o exercício físico pode ser gerado por uma origem extracerebral desta proteína, como os músculos (Hasselblatt et al., 2004; Schulpis et al., 2007) e o tecido adiposo (Lie et al., 2004; Netto et al., 2006). Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer o efeito do exercício voluntário sobre a proteína S100B.

Ao contrário dos nossos resultados no estudo dos efeitos do exercício forçado, o protocolo de exercício voluntário mostrou exercer significativa influência sobre os níveis de BDNF nas fatias hipocampais, aumentando-os, em concordância com outros estudos (Gomez-Pinilla et al., 2008; Khabour et al., 2010; Kitamura et al., 2003; Vaynman et al., 2004). Dentre as neurotrofinas, o BDNF é o melhor candidato para mediar os benefícios de longa-duração do exercício físico sobre o SNC (Cotman and Berchtold, 2002). Uma pesquisa investigou os efeitos dos exercícios voluntário, involuntário e forçado, em condições semelhantes de intensidade de treinamento, sobre o BDNF e recuperação das funções motoras após o modelo de isquemia cerebral em ratos. Os três tipos de exercício aplicados neste estudo promoveram melhora dos escores do comportamento motor em relação ao grupo controle, mas o exercício voluntário induziu maior aumento dos níveis de BDNF e melhor recuperação motora quando comparado com os exercícios forçado e involuntário e grupo controle. O exercício em rodas de correr é relacionado com o aumento da neurogênese em roedores adultos (van Praag et al., 1999b). Pesquisas apontam que o aumento da plasticidade

sináptica e melhora da performance cognitiva relacionada ao hipocampo podem estar baseadas no aumento dos níveis das neurotrofinas e outros fatores de crescimento, incluindo o BDNF, que são induzidas pelo exercício voluntário (Clark et al., 2008; Nichol et al., 2007; van Praag et al., 1999a; van Praag et al., 1999b). Contrastando com estes resultados, os níveis de BDNF no córtex, cerebelo e hipotálamo não são alterados pelo exercício voluntário (Fuss et al., 2010). Isto parece sugerir um efeito específico do exercício voluntário sobre os níveis de BDNF hipocampal e neurogênese.

Podemos sugerir que os níveis aumentados de BDNF produzidos pela corrida voluntária tem participação no aumento da atividade da GS encontrado em nosso estudo. Esta neurotrofina pode estar regulando positivamente a expressão da GS. Um estudo *in vitro* investigou se o BDNF era capaz de regular a GS em células de Muller da retina sob condições normais e hipóxicas. Os resultados deste estudo indicam que parte da habilidade neuroprotetora do BDNF é uma consequência de sua habilidade de regular positivamente a GS (Dai et al., 2012).

Em resumo, nossos dados mostram que a corrida em esteira (4 semanas) foi capaz de induzir uma diminuição no conteúdo de GFAP (avaliado por ELISA e imunohistoquímica) e aumento da atividade da GS. Estas mudanças podem ser mediadas pela corticosterona, cujos níveis foram elevados no soro. Neste protocolo, o BDNF, outro potencial regulador da expressão destas proteínas astrogliais, não foi alterado no tecido hipocampal. Além disso, o exercício em esteira causou uma diminuição no conteúdo de NO e não foram observadas mudanças nos parâmetros astrogliais tais como captação de glutamato e glicose, conteúdo de GSH e proteína S100B. Nossos resultados em relação ao protocolo de exercício voluntário em rodas de correr (4 semanas) mostraram um significativo aumento nos níveis de BDNF e da enzima GS no hipocampo de ratos. Sugerimos que, possivelmente, o BDNF possa estar regulando positivamente os níveis de GS hipocampal. Tomados juntos, estes dados indicam específicas mudanças nos marcadores astrocíticos induzidas pelo exercício físico, a importância dos astrócitos na plasticidade cerebral, bem como reforçam a relevância do exercício físico como uma estratégia para neuroproteção. O número de questões não respondidas geradas por este cenário demonstram a necessidade de mais estudos relacionados aos efeitos do exercício forçado e voluntário sobre os astrócitos. É importante que este conhecimento seja trasladado em tratamentos efetivos para doenças do SNC envolvendo alterações astrocíticas. Nossa contribuição com este estudo é mais um passo nesta direção, mostrando evidências de que os exercícios forçado e voluntário não são equivalentes em

relação aos seus efeitos sobre os astrócitos e a importante participação destas células nos mecanismos através dos quais o exercício físico exerce seus efeitos no SNC.

3.2 Efeito do exercício físico (esteira ergométrica e dança) sobre os astrócitos no SNC danificado

É extremamente importante conhecer quais intervenções de reabilitação são efetivas na facilitação da recuperação motora e regulação positiva de fatores neurotróficos, os quais levam à melhora da aprendizagem e memória, após danos ao SNC. A corrida em esteira ergométrica tem sido amplamente aplicada como uma estratégia de reabilitação em estudos clínicos e em modelos animais (Ke et al., 2011). Pacientes que sofreram acidente vascular isquêmico, por exemplo, apresentaram diminuição do gasto energético e melhora na eficiência motora grossa, além de melhora na deambulação, após a prática de exercício em esteira (Ada et al., 2003). Em modelos animais de isquemia cerebral, o exercício em esteira promoveu redução do volume do infarto e melhora das consequências funcionais, quando praticado antes (Hayes et al., 2008) ou após (Yang et al., 2003) o dano ao SNC.

Uma alternativa terapêutica para pacientes com lesões no SNC, além do exercício em esteira, é a prática da dança. Dentre os tipos de exercício físico, a dança tem sido uma ferramenta de escolha para diferentes estudos experimentais, os quais vêm acumulando evidências quanto aos benefícios terapêuticos que a dança promove em indivíduos com idade avançada (Hamburg and Clair, 2003; Keogh et al., 2009), em pacientes com Doença de Parkinson (Earhart, 2009; Hackney and Earhart, 2009; Hackney and Earhart, 2010a), câncer (Aktas and Ogce, 2005), Doença de Alzheimer e demência vascular (Hokkanen et al., 2008), indivíduos com diabetes (Murrock et al., 2009) e insuficiência cardíaca crônica (Belardinelli et al., 2008).

Além das estratégias reabilitadoras, as intervenções preventivas nesta área são de extrema relevância. Ainda que a genética e a idade tenham grande importância na evolução das doenças, grande parte dos fatores de risco pode ser influenciada por modificações no estilo de vida, de forma a reduzir os eventos patológicos e aumentar a sobrevida de pacientes portadores de doenças do SNC. A mudança de hábitos alimentares e a prática de atividade física são modificações do estilo de vida que podem contribuir para a melhora dos fatores de risco para doenças do SNC, como por exemplo, processos inflamatórios periféricos. No entanto, a efetividade do exercício em esteira

ergométrica e da dança sobre os processos inflamatórios do SNC não tem recebido muita atenção nas pesquisas atuais.

O **ARTIGO 3** objetivou avaliar a influência do pré-condicionamento físico através da esteira ergométrica sobre a inflamação hipocampal induzida pela administração sistêmica de LPS em ratos. Nossos resultados mostraram que o exercício de corrida regular moderado em esteira (20 minutos diários durante 2 semanas) protegeu o hipocampo da elevação da expressão de TNF- α induzida pelo LPS. Já foi relatado que a administração de LPS e a consequente ativação de citocinas inflamatórias como o TNF- α , reduzem a neurogênese (Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003) e aumentam a apoptose no encéfalo (Nolan et al., 2003). Além disso, o aumento de citocinas pró-inflamatórias está envolvido em patologias como Doença de Alzheimer, Esclerose Múltipla, Acidente Vascular Cerebral e desordens neuropsiquiátricas (Dik et al., 2005; Holmes et al., 2003; McAfoose and Baune, 2009). Esta pesquisa também mostrou que tais efeitos vantajosos do exercício em esteira contra as alterações induzidas pelo LPS podem ser mediados pela S100B, uma vez que os níveis desta proteína foram regulados positivamente no fluído cerebrospinal (*cerebral spinal fluid*, CSF) dos animais treinados.

A periférica administração (intraperitoneal) de LPS na dose de 1mg/kg de peso corporal, a qual não induz sepse, causa uma inflamação sistêmica (Czapski et al., 2007) que é caracterizada pelo comportamento-doente (*sickness behavior*) que inclui aumento da temperatura (Czapski et al., 2004; Czapski et al., 2006) e diminuição na atividade locomotora (Bluthe et al., 1992; Henry et al., 2008). Nossos resultados mostraram que os ratos injetados com LPS apresentaram aumento da temperatura e menor latência para queda na tarefa do Rota-rod, o que indica que a administração de LPS, neste estudo, foi efetiva na promoção do comportamento-doente. O grupo exercício/LPS (EXE/LPS) apresentou pior performance no Rota-rod quando comparado com os outros grupos. É importante esclarecer que esta performance foi avaliada 6 horas após a administração de LPS e que este ponto coincide com o aumento da temperatura corporal apresentado pelos animais, o que está de acordo com estudos prévios (Tokes et al., 2011). Neste momento, o exercício físico, que foi realizado 6 horas antes da tarefa, pode ter atuado como um estressor aumentando a intensidade do comportamento-doente nos animais do grupo EXE/LPS.

A sinalização do TNF- α está criticamente envolvida na perturbação da atividade hipocampal subjacente à aprendizagem e memória e a inibição da síntese de TNF- α

demonstrou ser capaz de restaurar a função cognitiva a partir de uma perspectiva celular e comportamental (Belarbi et al., 2012). A aprendizagem espacial requer o controle das funções integrativas do hipocampo e foi mostrado que a administração periférica de LPS prejudica o desempenho dos animais em tarefas de memória espacial como o Labirinto Aquático de Morris e o Teste do Labirinto em Y (Arai et al., 2001; Hauss-Wegrzyniak et al., 2000; Shaw et al., 2001; Wu et al., 2007). A Tarefa de Reconhecimento de Objetos é uma forma de aprendizagem dependente do hipocampo que tem recebido muita atenção recentemente (Hennigan et al., 2007). Estudos tem mostrado que a consolidação da memória de reconhecimento é dependente da ativação da ERK no giro denteado (Hennigan et al., 2007; Kelly et al., 2003a; Kelly et al., 2003b) e que estas alterações associadas à aprendizagem são inibidas pelo LPS (Hennigan et al., 2007; Jacewicz et al., 2009; Miwa et al., 2011). Nossos resultados mostraram que a administração sistêmica de LPS não afetou a Tarefa de Reconhecimento de Objetos de curta e de longa duração, contrariando estudos prévios (Belarbi et al., 2012; Hauss-Wegrzyniak et al., 2000). Uma possível causa destes resultados controversos pode ser os diferentes parâmetros utilizados por estes estudos como espécie do animal (ratos ou camundongos), via de administração (intraperitoneal ou intracerebroventricular), doses (variam de μg até mg), tempo de administração (aguda ou crônica) e momento em que a tarefa comportamental foi avaliada (variando de horas até dias após a administração de LPS). Estas variações fazem com que os resultados sejam inconclusivos, demonstrando que mais estudos são necessários para esclarecer este assunto. Outra possível explicação para este resultado é que este protocolo (administração aguda de LPS, 1mg/kg de peso corporal) danifica a cognição dependente do espaço, mas não prejudica a cognição independente do espaço. Esta hipótese está de acordo com Belarbi et al. (2012) que observou que ratos com neuroinflamação crônica apresentaram pior performance nos testes de retenção de memória e aprendizagem espacial, mas não encontrou alteração no Teste de Reconhecimento de Objetos.

Os astrócitos são ativados em resposta ao dano no SNC e apresentam aumento dos níveis de moléculas de adesão e da produção de várias citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, neuropeptídeos (Chen and Swanson, 2003) e espécies reativas de oxigênio (Fuller et al., 2010; McGeer and McGeer, 2004), consequentemente provocando uma resposta inflamatória encefálica. A astrogliose pode ser considerada

uma tentativa dos astrócitos de restaurar a homeostase no encéfalo danificado através de importantes funções como, por exemplo, a formação de cicatriz glial (Sofroniew, 2009). Dois fatores são estabelecidos marcadores de astrogliose: a glutamina sintetase (GS) (Aras et al., 2012; Eddleston and Mucke, 1993) e a proteína S100B (De Filippis et al., 2011; Rothermundt et al., 2003; Tramontina et al., 2002; Yan et al., 2003). Em nossa pesquisa, a inflamação sistêmica induzida pela administração de LPS não causou gliose reativa no hipocampo, uma vez que nós não observamos alterações na atividade da GS e no conteúdo de S100B. Além disso, não foi observado estresse oxidativo neste modelo pois não foram encontradas alterações na produção de espécies reativas de oxigênio e nos níveis de glutatona. Uma possível explicação para este resultado é que a dose de LPS utilizada neste estudo não foi suficiente para induzir estas alterações.

A sinalização endotelial após a administração periférica de LPS aumenta o transporte de citocinas pró-inflamatórias através da BHE (Pan et al., 2008). A ligação do LPS com o complexo TLR-4/MD-2/CD14 leva à produção de TNF- α (Tokes et al., 2011). Esta pesquisa mostrou que o LPS administrado sistemicamente induziu um aumento nos níveis de TNF- α no hipocampo de ratos, confirmando estudos prévios (Czapski et al., 2010; Williamson et al., 2012). Tem sido mostrado que o exercício físico inibe a produção de TNF- α no encéfalo (Ding et al., 2005), plasma (Bagby et al., 1994; Tanaka et al., 2010), soro (Mussi et al., 2008) e Banda Horizontal Diagonal da Broca no *septum* (Ang et al., 2004). Nossos achados são consistentes com estes estudos prévios e demonstram que o pré-condicionamento com exercício em esteira ergométrica reduz os níveis de TNF- α que foram aumentados pela administração de LPS, prevenindo os efeitos deletérios da regulação positiva desta citocina no hipocampo. De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo investigando os efeitos do pré-condicionamento em esteira sobre a prevenção das alterações causadas pelo LPS injetado na periferia.

Um dos mecanismos candidatos à indução dos efeitos benéficos do exercício em esteira contra danos induzidos pelo LPS é a regulação positiva da sinalização do BDNF (Wu et al., 2007). O resultado de nossa investigação são opostos a estudos anteriores que mostraram um aumento da expressão de BDNF no encéfalo de roedores, induzido pela atividade física (Gomez-Pinilla et al., 2002; Oliff et al., 1998; Radak et al., 2006). O protocolo utilizado em nossa pesquisa (20 minutos diários durante 2 semanas) não produziu efeito sobre os níveis de BDNF nos ratos exercitados, confirmando as observações de Cechetti et al. (2008). Uma vez que este protocolo de exercício mostrou

ser protetor contra danos encefálicos (Cechetti et al., 2007; Cechetti et al., 2012; Scopel et al., 2006) e melhorar a memória através de mecanismos anti-inflamatórios (Lovatel et al., 2012), nossos resultados indicam que o efeito neuroprotetor do exercício em esteira ergométrica pode não ser dependente da expressão de BDNF (Cechetti et al., 2008).

Em relação aos efeitos do LPS sobre a expressão de BDNF, as pesquisas existentes apresentam resultados conflitantes. Elkabes et al. (1998) mostrou que a expressão de BDNF não é alterada no encéfalo de ratos na presença de LPS, enquanto que Miwa et al. (1997) observou que o LPS estimula a síntese de BDNF, e Guan and Fang (2006) mostrou que o LPS causa uma diminuição na expressão de BDNF no hipocampo e córtex. Nossos resultados estão de acordo com Shaw et al. (2001) que também não encontrou diferença na concentração de BDNF entre os diferentes grupos tratado e controle após LPS. Então, mais pesquisas necessitam explorar esta questão.

A respeito dos mecanismos que podem ser responsáveis pelo efeito preventivo do exercício em esteira sobre a inflamação cerebral, nosso estudo sugere que a proteína S100B pode exercer um importante papel, visto que seus níveis encontraram-se aumentados no CSF dos animais exercitados. Muitas investigações tem confirmado um efeito neuroprotetor da S100B, em baixas concentrações, sobre os neurônios (Huttunen et al., 2000; Li et al., 1998; Rickmann et al., 1995). O aumento dos níveis de S100B no CSF encontrado em nosso estudo coincide com a prevenção do aumento do conteúdo de TNF- α no hipocampo de ratos exercitados submetidos ao LPS. Outros estudos tem mostrado o efeito preventivo da S100B. Reali et al. (2005) observou que as respostas nocivas ao tratamento com cloreto de trimetilestanho (*trimethyltin*, TMT) podem ser prevenidas pelo pré-tratamento de cultura de astrócitos e microglia com doses nanomolares de S100B. Este trabalho mostrou que a S100B modifica a expressão basal de TNF- α nos astrócitos pela ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) nas células gliais (Lam et al., 2001; Reali et al., 2005). Isto sugere que a S100B pode ter um papel na manutenção dos níveis de TNF- α baixos em condições normais e provavelmente durante os estágios iniciais das lesões encefálicas. Outro estudo mostrou que a S100B secretada durante a resposta glial ao dano encefálico exerce efeitos neuroprotetores e neuroregenerativos nas desordens psiquiátricas. Este trabalho sugere que a ativação do NF- κ B é necessária para que estes efeitos da S100B ocorram (Kogel et al., 2004). Além disso, tem sido relatado um efeito positivo da S100B sobre a consolidação da memória (Mello e Souza et al., 2000), melhora da neurogênese e recuperação cognitiva após

lesão encefálica traumática (Kleindienst et al., 2005; Kleindienst and Ross Bullock, 2006). A S100B extracelular também parece apresentar efeito protetor sobre os neurônios hipocámpais contra danos neurotóxicos (Kogel et al., 2004; Tramontina et al., 2006). Estas ações da S100B demonstram que esta proteína pode ser uma das responsáveis pelos efeitos benéficos neuroprotetores promovido pelo exercício em esteira.

Em nosso estudo, os níveis de S100B no hipocampo dos ratos sedentários submetidos ao LPS, estavam diminuídos em relação aos ratos controle exercitados. Em relação à diminuição da S100B em ratos infectados, Ohtaki et al. (2007) mostrou que a expressão desta proteína foi significativamente reduzida em cérebros infectados com o vírus da Doença de Borna (VDB), sugerindo que esta regulação negativa pode estar associada com a duração da resposta inflamatória no SNC e expressão crônica de mediadores inflamatórios. Outro estudo também mostrou que o tratamento com Interferon Gama regulou negativamente a expressão gênica de S100B em astrócitos primários de camundongo (Halonen et al., 2006). Baseados nestas observações, nós podemos sugerir que a diminuição dos níveis de S100B no CSF em ratos submetidos ao LPS pode estar relacionada à expressão crônica de mediadores inflamatórios, uma vez que o aumento do TNF- α persistiu até 3 dias após a administração de LPS nos animais do grupo sedentário/LPS (SED/LPS).

Periféricamente, a S100B apresentou um perfil similar ao apresentado no hipocampo sendo observado aumento dos níveis de S100B nos animais exercitados. Diversos estudos relataram que o exercício físico (basquete, corrida, futebol, natação, boxe) aumentou os níveis de S100B no sangue dos praticantes (Dietrich et al., 2003; Hasselblatt et al., 2004; Otto et al., 2000; Schulpis et al., 2007; Stalnacke et al., 2003; Stalnacke et al., 2004). Este aumento não teve relação com o efeito da aceleração/desaceleração produzidos pelo exercício uma vez que a prática de *bungee jumping* não afetou a liberação de S100B para o sangue (Woertgen et al., 2002). Outra pesquisa avaliou a S100B no soro de nadadores e observou um aumento nos níveis pós-exercício comparado com o repouso, nos mesmos sujeitos (Dietrich et al., 2003). Estes resultados fortemente sugerem que este aumento não está relacionado ao dano encefálico mas que mecanismos fisiológicos envolvendo a liberação de hormônios e neurotransmissores durante o exercício, estimulam a secreção de S100B pelos astrócitos (Dietrich Mde et al., 2004). Além disso, é importante levar em consideração as origens extracerebrais da S100B (adipócitos, células de Schwann, melanócitos e condrócitos)

que influenciam seus níveis no sangue (Anderson et al., 2001; Dietrich et al., 2003). O aumento dos níveis sorológicos de S100B em ratos exercitados pode estar relacionado com sua atividade trófica no SNC ao invés de estar relacionado ao dano (Dietrich Mde et al., 2004). Então, de acordo com as evidências experimentais de que o exercício físico estimula a síntese e liberação de fatores tróficos no SNC (Berchtold et al., 2005; Cotman and Berchtold, 2002; Cotman et al., 2007) promovendo plasticidade e resistência cerebral, nós sugerimos que os níveis aumentados de S100B no soro dos animais exercitados está relacionado com a ação trófica desta proteína no SNC.

Os achados de nosso estudo podem não somente esclarecer os mecanismos da neuroproteção promovida pelo exercício em esteira, mas também ajudar no desenvolvimento de novas estratégias para terapia anti-inflamatória. De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo mostrando o papel neuroprotetor da S100B sobre o hipocampo de ratos exercitados submetidos ao LPS. Então, o treinamento em esteira pode ser um método preventivo contra inflamação aguda que leva ao desenvolvimento de patologias como Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, Esclerose múltipla, Acidente Vascular Encefálico e desordens psiquiátricas.

Dentre as patologias que comprometem o SNC e envolvem alterações inflamatórias sistêmicas e periféricas, tem-se a Lesão da Medula Espinhal como uma de suas representantes (Wang et al., 2007). O tratamento de reabilitação convencional destinado às pessoas acometidas por lesões da medula espinhal, prima por estratégias compensatórias para a manutenção da mobilidade e fortalecimento dos segmentos corporais acima do nível da lesão (Somers, et al., 1992; Atrice et al., 1995). Felizmente, o campo da neurorreabilitação está mudando. Após anos de evidências a partir de dados da ciência básica, finalmente os princípios reabilitadores enraizados, focados na compensação e adaptação, estão sendo modificados. Estratégias para estimulação do SNC estão sendo utilizadas para otimizar a recuperação funcional e desenvolvimento de habilidades que acreditava-se estarem perdidas para sempre no momento da lesão (Sadowsky and McDonald, 2009). A ciência básica tem mostrado que o SNC adulto é capaz de reorganizar-se, permitindo uma significativa melhora após as lesões do SNC. Esta reorganização ocorre em todos os diferentes níveis: cortical, subcortical, medular e no sistema nervoso periférico. Este processo de reparo pode acontecer através de diferentes mecanismos como a plasticidade sináptica em conexões pré-existentes (periféricas e centrais) e o brotamento e a formação de novas conexões. A remielinização e o nascimento de novas células também ocorre, corrigindo, restaurando

e substituindo células do SNC danificado (Sadowsky and McDonald, 2009). Além disso, a contenção do processo inflamatório presente nas lesões do SNC também é parte essencial do mecanismo de recuperação das áreas danificadas.

Sabe-se que os processos celulares e moleculares que contribuem para a recuperação do SNC são dependentes da manutenção e nível ótimo de atividade neurológica. A dança, por ser uma atividade que envolve estimulação sensorial, proprioceptiva e emocional pode contribuir para estes processos de reparo interferindo nos processos bioquímicos, inflamatório, metabólicos e comportamentais associados a lesões da medula espinhal. Com o objetivo de avaliar esta possibilidade, a pesquisa apresentada no **ARTIGO 4** foi desenvolvida.

Os resultados deste estudo mostraram que, após 4 semanas de prática da dança, os indivíduos com lesão medular apresentaram melhora da independência funcional e equilíbrio e diminuição dos sintomas de estresse e depressão. Ademais, os níveis de BDNF sorológicos apresentaram-se elevados, o que sugere que, possivelmente, esta neurotrofina esteja envolvida nos benefícios observados com a prática da dança. Contrariando nossa hipótese inicial, os indivíduos com LM não apresentaram alterações nos parâmetros metabólicos (CT, GLI e TG), imuno-endocrinológicos (PCR, cortisol) e gliais (GFAP e S100B).

A Medida de Independência Funcional (MIF) avalia a independência do indivíduo com LM em seis dimensões: autocuidados, controle de esfínteres, transferências, locomoção, comunicação e cognição social (Keith et al., 1987). É uma escala de grande aceitação na literatura mundial e apresenta a vantagem de avaliar os componentes motores e cognitivos. Já o Índice de Barthel é um instrumento que detecta a capacidade de realização de 10 atividades básicas da vida diária, dando maior importância à pontuação dos temas relacionados ao controle de esfínteres e mobilidade. As atividades de vida diária avaliadas incluem: comer, transferir-se da cadeira para a cama, higiene pessoal, uso do vaso sanitário, banhar-se, deslocar-se (andar em superfície lisa ou em cadeira de rodas), subir e descer escadas, vestir-se, controle de fezes e urina (de Araújo e Silva, 2011). Os resultados desta pesquisa mostraram que os indivíduos com LM submetidos à prática de 4 semanas de dança apresentaram melhora em relação à Medida de Independência Funcional e Índice de Barthel. Como afirmado anteriormente, este parece ser o primeiro estudo analisando o efeito da dança sobre a capacidade funcional de indivíduos com lesão medular. Desta forma, torna-se difícil a comparação dos resultados com trabalhos prévios. Um estudo

analisou o efeito de 8 sessões de dança em cadeira de rodas sobre o controle de movimentos de tronco em indivíduos paraplégicos, antes e após a intervenção. Os praticantes de dança apresentaram uma tendência ao ganho de amplitude de movimento de tronco, enquanto que o grupo controle não apresentou melhora neste parâmetro. Porém, este estudo não é conclusivo devido ao pequeno tamanho da amostra (n=4) (Peres et al., 2007). Uma pesquisa envolvendo indivíduos com Doença de Parkinson relatou melhora na mobilidade destes indivíduos após um programa de dança com Tango Argentino, em relação àqueles que realizaram um programa de exercícios tradicionais (Hackney et al., 2007). Em concordância com estes achados, a participação, durante 16 semanas, em um programa de exercícios combinando atividades de mobilidade, resistência aeróbica, fortalecimento, coordenação, recreação e relaxamento, promoveu significativo aumento dos escores da MIF em pacientes com paraplegia (Duran et al., 2001). Sabe-se que a dança também envolve este tipo de atividade, então, neste sentido, podemos sugerir que a dança pode influenciar positivamente a capacidade funcional dos indivíduos com LM. Especula-se que os ganhos com mobilidade, transferências e execução das atividades de vida diária podem ter ocorrido em decorrência do esforço realizado pelos membros superiores e tronco para as atividades de dança propostas e para manutenção da posição ortostática (para aqueles que podiam adotar esta posição) durante a dança.

Quando analisamos os ganhos de capacidade funcional em relação aos níveis de lesão, os resultados mostraram que os indivíduos com ASIA C apresentaram os maiores ganhos neste item, quando avaliados pela escala de Barthel. Possivelmente isto tenha ocorrido porque estes são os indivíduos que apresentam maior potencial de recuperação em relação aos níveis ASIA A e B por apresentarem função motora preservada abaixo do nível neurológico e contração muscular em mais da metade dos músculos chaves abaixo do nível neurológico. Os indivíduos com ASIA D e E, por terem função motora preservada em mais da metade ou em todos os músculos abaixo do nível neurológico, respectivamente, já apresentavam um grau adequado de funcionalidade, não apresentando alteração significativa dos escores nas escalas aplicadas. Contudo, nós não encontramos correlação estatística entre o nível da lesão e a capacidade funcional avaliada pelas escalas. Cabe ressaltar que estas escalas avaliam a execução ou não da atividade e não avaliam a qualidade da execução. Apesar dos indivíduos ASIA D e E não apresentarem diferença significativa nos itens das escalas aplicadas, foi observado pela pesquisadora e pelos próprios participantes a melhora significativa na qualidade

dos movimentos executados. Infelizmente, esta é uma limitação que os instrumentos de medida utilizados no campo da reabilitação apresentam, tornando difícil de ser mensurados os benefícios em relação à qualidade com que se realiza as tarefas analisadas. Conforme já relatado, atualmente a reabilitação foca na funcionalidade com qualidade e não na compensação.

As implicações dos ganhos nas escalas MIF e Barthel repercutem diretamente sobre as atividades de vida diária dos indivíduos com LM, que foram confirmadas através dos relatos dos mesmos referindo ter observado: melhora na mobilidade, na execução dos movimentos e na independência, aumento da autoconfiança, maior estabilidade para caminhar (nos indivíduos que tinham esta possibilidade) e melhora no controle de tronco (nos indivíduos usuários de cadeira de rodas), maior facilidade para transferências, aumento da força, da continência, da agilidade e sociabilidade, diminuição da espasticidade, sentimento de felicidade, aumento da sensação de bem-estar, maior motivação, vontade de ajudar os outros, vontade de voltar a estudar/trabalhar, melhora do equilíbrio, da sexualidade, diminuição da dor e aumento da esperança. Sendo que os benefícios mais citados foram: aumento da mobilidade e independência, maior facilidade para transferências, melhora do equilíbrio e controle de tronco, aumento da continência e aumento da sensação de bem-estar e felicidade.

No caso da continência, 24% dos indivíduos referiram melhora neste item. Estes apresentavam classificação ASIA A, C e E. Nestes casos, pode-se especular que a dança, em razão de exigir muitos movimentos de membros superiores (com estabilidade) e tronco pode ter levado ao trabalho da musculatura abdominal e lombar, responsáveis pela manutenção da estabilidade de tronco em uma condição de contração isométrica e isotônica para manutenção em posição ereta. Como consequência, o desenvolvimento de controle da musculatura do períneo e adjacente à bexiga pode ter sido estimulado.

A melhora da capacidade funcional está diretamente relacionada à melhora do equilíbrio. Os indivíduos com LM significativamente melhoraram os escores na Escala de Equilíbrio de Berg, a qual indica a melhora da habilidade funcional estando o indivíduo em pé ou sentado. Quando analisamos os ganhos obtidos em relação ao nível de lesão, observamos que todos os indivíduos, independente da classificação ASIA, apresentaram ganhos no equilíbrio. Contudo, foram encontradas correlações positivas estatisticamente entre o nível de lesão e o equilíbrio, mensurado pela Escala Berg, tanto no início quanto no final da intervenção com dança. As mudanças positivas no

equilíbrio apresentadas pelos indivíduos com LM estão de acordo com as mudanças no equilíbrio promovidas pela dança em indivíduos com Doença de Parkinson (Hackney and Earhart, 2009; Hackney and Earhart, 2010a; Hackney and Earhart, 2010b). Esta melhora no equilíbrio pode estar relacionada aos exercícios de dança que envolviam movimentos em diferentes planos (alto, médio e baixo), às transferências realizadas da cadeira para o chão (nas atividades em colchonete) e às solicitações do movimento de sentar e levantar para aqueles indivíduos que tinham esta capacidade. Além disso, os pacientes que deambulavam tinham seu equilíbrio constantemente desafiados pelos movimentos da dança e interação com os colegas nas atividades em dupla ou em grupo. Embora a validade e reprodutibilidade da Escala de Berg tenha sido estabelecida (Lemay and Nadeau, 2010; Wirz et al., 2010), uma limitação encontrada na utilização da Escala de Berg foi o fato de que a capacidade e performance na posição sentada pouco contribuem para o escore geral da escala (Datta et al., 2009; Forrest et al., 2012), porém, não encontramos outra escala que avalie o equilíbrio na posição sentada para ser utilizada nos pacientes usuários de cadeira de rodas. Esta mudança no equilíbrio dos indivíduos com LM praticantes de dança pode transpor-se para a facilitação das transferências para e a partir de todas as superfícies, melhora do uso independente da mobilidade da cadeira de rodas e alívio da pressão sobre as tuberosidades isquiáticas na posição sentada, além da diminuição da necessidade de assistência de terceiros. Para os indivíduos que deambulavam com o auxílio de dispositivos auxiliares ou independentemente, mas com compensações, a melhora do equilíbrio contribuiu significativamente para uma marcha de qualidade e, em alguns casos, totalmente independente, conforme nossas observações e relatos dos pacientes.

Outro benefício que pode estar relacionado aos efeitos da dança nesta população, foi a diminuição dos sintomas de estresse e depressão medidos através da Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão (*Hospital Anxiety and Depression Scale*, HADS). Esta escala é um instrumento popular entre pesquisadores de diferentes nacionalidades e é utilizada para acessar casos de desordens de ansiedade e depressão, bem como da severidade dos sintomas, em pacientes e na população em geral (Montazeri et al., 2003). Independentemente do nível da lesão, todos os indivíduos participantes das aulas de dança apresentaram melhora significativa dos sintomas de estresse e depressão. De acordo com o escore da escala, na avaliação inicial 52% dos indivíduos apresentavam sintomas de ansiedade e/ou depressão; ao final do estudo os sintomas foram completamente revertidos nestes indivíduos. Não há relatos na literatura sobre a

influência da dança sobre o status psicológico de estresse e depressão em indivíduos com lesão medular. Nossos resultados benéficos em relação a este aspecto podem ser explicados, possivelmente, pela natureza social da dança, bem como pela sua influência sobre aspectos como autonomia, imagem corporal, autoestima e motivação. A dança influencia o humor (Jeong et al., 2005) e vida social (Palo-Bengtsson et al., 1998). A dança é uma atividade agradável e é associada com aumento da motivação para participação em atividades relacionadas ao exercício. Ela não somente expande o repertório de atividades físicas, mas também aumenta o envolvimento do indivíduo na comunidade, estimula o desenvolvimento pessoal e a expressão de si mesmo (Earhart, 2009). A dança permite a expressão de sentimentos o que faz com que a mente se afaste dos pensamentos relacionados à doença (Hackney and Earhart, 2009a). Os indivíduos sentem seu humor melhorado (Hackney et al., 2007) e sua ansiedade diminuída (Leste and Rust, 1984). A escolha da música também tem importante influência sobre o estado da mente (Pacchetti et al., 2000). A atmosfera positiva durante as classes de dança são um fator adicional (Earhart, 2009). Em nosso estudo, além da melhora apresentada na análise quantitativa, todos os participantes relataram melhora do seu estado emocional após as classes de dança.

Verificou-se, em nosso estudo, que a GLI, os TG e o CT não apresentaram alteração significativa após a prática da dança. Na avaliação inicial, 3 indivíduos apresentavam níveis aumentados de GLI no sangue (≥ 110 mg/dL) e a dança foi capaz de reverter estes valores para a normalidade. Em relação ao colesterol, 5 indivíduos apresentaram valores acima de 200 mg/dL e a dança foi capaz de reverter este aumento em 2 casos. Os níveis de triglicerídeos estavam aumentados (≥ 150 mg/dL) em 4 indivíduos e somente 2 tiveram os níveis de TG reduzidos após a atividade de dança. Em relação ao nível de lesão medular, os resultados mostraram que os indivíduos com ASIA D apresentaram aumento significativo dos níveis de TG na reavaliação, após 4 semanas de prática da dança, porém estes níveis permaneceram dentro da normalidade. Este resultado pode ser devido à falta de controle de hábitos alimentares durante a intervenção (Varady and Jones, 2005). Em geral, o fato da dança não ter exercido efeito sobre os parâmetros metabólicos pode ser parcialmente explicado pela curta duração da prática da atividade. Segundo alguns estudos, programas de atividade física com mais de 12 semanas de duração são capazes de promover a redução do colesterol-LDL e do TG, e aumento do colesterol-HDL (Leon and Sanchez, 2001; Yuan et al., 2007), o que foi confirmado por Lavis et al. (2007) em indivíduos com LM. Além disso, parece que

são as atividades físicas de maior intensidade que promovem os efeitos positivos no perfil lipídico (Kraus et al., 2002; Yuan et al., 2007). Um estudo mostrou que indivíduos com LM submetidos ao exercício aeróbico de baixa intensidade não apresentaram alterações nos níveis de CT, TG, HDL e LDL (Duran et al., 2001). Possivelmente os mesmos fatores relacionados ao tempo de execução da atividade e intensidade da mesma sejam determinantes para o efeito da dança sobre o parâmetro da glicemia em jejum.

É sabido que mudanças hormonais geralmente acompanham as alterações do sistema imune incluindo a elevação do hormônio adenocorticotrófico (ACTH) e aumento dos níveis de cortisol no plasma e urina (Cruse et al., 2000). Em relação aos parâmetros imuno-endocrinológicos (proteína C reativa e cortisol) avaliados neste estudo, a dança não foi capaz de promover alterações em seus níveis. Tem sido descrito níveis aumentados circulantes de PCR em homens com LM, livres de úlcera de pressão e infecções sintomáticas agudas (Frost et al., 2005; Manns et al., 2005; Wang et al., 2007). Em nosso estudo, 52% dos indivíduos (13) apresentaram estes níveis aumentados (> 5 mg/L) antes da prática da dança e, ao final do estudo, apenas 3 destes indivíduos tiveram os valores normalizados, confirmando que nosso protocolo de dança não é capaz de interferir significativamente nos níveis da PCR. Um estudo observou a variação diurna do cortisol salivar em pessoas com LM e não encontrou diferenças em relação ao grupo controle, com um esperado padrão de declínio gradual entre a manhã e a noite (Kalpakjian et al., 2009) e nossos resultados estão de acordo com esta pesquisa, mostrando que os indivíduos com LM não apresentaram níveis alterados de cortisol. Em relação ao efeito da dança, de acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a investigar os níveis de cortisol, após esta prática, em indivíduos com LM.

Muitas evidências têm surgido em relação à resposta inflamatória e autoimune imediatamente após a LM, no entanto, pouco é conhecido sobre o status imunológico de indivíduos cronicamente lesados (Hayes et al., 2002). Uma vez que a lesão medular tem sido relacionada às alterações no SNC, especificamente no hipocampo (Gomez-Pinilla et al., 2012) e que níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-2 foram encontrados no soro de pacientes com LM crônica, livres de infecções (Hayes et al., 2002), nós analisamos os níveis sorológicos de dois marcadores de ativação de astrócitos: GFAP e S100B. Os níveis de GFAP no soro dos indivíduos com LM não apresentaram alteração significativa após a prática da dança. Os níveis de S100B encontraram-se abaixo dos níveis de detecção do kit utilizado para mensuração,

tanto na avaliação inicial quanto na final. Estes resultados sugerem que os participantes deste estudo não apresentavam reatividade astrocítica no momento da avaliação inicial e que a prática de dança durante 4 semanas não promoveu alteração neste parâmetro. Este resultado parece ser positivo, pois a reatividade glial está relacionada às consequências funcionais após a LM. Um modelo bioquímico foi estabelecido usando as proteínas S100B, GFAP e interleucina 8 para prever a severidade da lesão (ASIA A, B ou C). Usando a concentração destas proteínas no CSF, 24 horas após a lesão, o modelo acuradamente predisse o grau ASIA em 89% dos pacientes. Além disso, a recuperação motora dos segmentos após 6 meses de LM foi melhor prevista através destas proteínas no CSF do que com o grau ASIA dos pacientes (Kwon et al., 2009).

Como citado anteriormente, nosso estudo mostrou que a dança é capaz de melhorar a capacidade funcional, equilíbrio e estado psicológico dos indivíduos com LM. Um dos mecanismos que podem estar mediando estes efeitos benéficos é o BDNF, uma vez que os níveis desta neurotrofina estavam aumentados após as 4 semanas de prática da dança. Os benefícios do BDNF já foram extensamente descritos ao longo desta revisão, além da capacidade do exercício físico de promover o aumento dos níveis desta proteína no SNC.

Em relação à LM, tem sido estabelecido que os déficits funcionais após a lesão são devidos, amplamente, à falha dos axônios danificados e seu pericário em exibir fortes respostas regenerativas. Contudo, recentes investigações indicaram que o tratamento do tecido do SNC danificado com BDNF e neurotrofina-3 (NT3) pode estimular a recuperação funcional pós-lesão através do aumento da sobrevivência dos neurônios e regeneração axonal. Na medula espinhal e encéfalo intactos, as células neuronais e não-neuronais, como os astrócitos (Dreyfus et al., 1999), produzem neurotrofinas (como o BDNF e S100B) e/ou exibem respostas mediadas por receptor para neurotrofinas (Cho et al., 1998; Koliatsos et al., 1993; Nakahara et al., 1996). Após a LM, BDNF e NT3 administrados via injeção (Schnell et al., 1994) reduzem a atrofia das projeções dos neurônios adultos para a ME e promovem a regeneração axonal. Além disso, recentemente, o envolvimento dos fatores neurotróficos, particularmente o BDNF, na regulação de desordens de humor e efeitos antidepressivos tem estado sobre intensa investigação. Estudos mostraram que os níveis reduzidos de BDNF predisõem a depressão, enquanto o aumento do BDNF no SNC produz efeito antidepressivo (Castren, 2004; Castren, 2005; Duman and Monteggia, 2006).

Enquanto os efeitos positivos dos fatores neurotróficos liberados durante o exercício no encéfalo e ME saudáveis e lesionados de roedores são bem reconhecidos (Cotman and Berchtold, 2002; Neeper et al., 1996), poucos estudos tem investigado as alterações dos fatores tróficos induzidas pelo exercício em humanos (Rojas Vega et al., 2008), e nenhuma explorou o efeito da dança sobre os níveis de BDNF em indivíduos com LM. Concordando com nosso estudo referido anteriormente (Artigo 2), onde demonstramos que o exercício voluntário não foi capaz de alterar os níveis de S100B e GFAP e que aumentava significativamente os níveis de BDNF no hipocampo, a dança, sendo uma atividade voluntária e motivadora, promoveu aumento dos níveis de BDNF e não alterou os marcadores astrocíticos no soro de indivíduos com LM. O aumento dos níveis de BDNF associado à melhora funcional e psicológica dos indivíduos após a prática da dança sugere que este pode ser um dos mecanismos através dos quais a dança aumenta a neuroplasticidade, melhorando a recuperação após a lesão na medula espinhal.

Diversas limitações deste estudo necessitam ser discutidas. Primeiro, a variação nos indivíduos participantes desta intervenção em relação ao nível da lesão medular, habilidade funcional e tempo de lesão pode ter interferido nos resultados. Embora nós tenhamos mostrado melhora significativa não somente em todos os pacientes, mas também dentro dos grupos ASIA A, C e D, uma maior quantidade de indivíduos em cada grupo poderia gerar um resultado mais expressivo. Ainda, seria interessante acrescentar indivíduos ASIA B e E à amostra. Em segundo lugar, as escalas utilizadas não descreviam os ganhos na qualidade de movimentos adquiridos com a prática da dança; como por exemplo, a agilidade com que os indivíduos deslocam a cadeira de rodas ou realizam as transferências, ou, por exemplo, um indivíduo que não conseguia alcançar um objeto no chão (usuário de cadeira de rodas) e passou a fazê-lo, ou ainda um indivíduo que deambulava independentemente com uma postura totalmente alterada e ativando grupos musculares desnecessários para realização da marcha e que ao final apresentava uma deambulação com as compensações reduzidas. A falta destas mensurações pode ter mascarado possíveis ganhos pós-intervenção. Uma terceira e importante limitação deste estudo foi a falta de um grupo controle. Nós não proporcionamos informação sobre se a dança é mais efetiva que a Fisioterapia ou outra intervenção reabilitadora ou desportiva.

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados nesta Tese nos permitem concluir que:

- Em situações de lesão do SNC, como nos casos de lesão da medula espinhal, a dança parece estimular mecanismos de reparo e regeneração no SNC, conseqüentemente promovendo a melhora da capacidade funcional, independência e equilíbrio dos indivíduos com lesão medular. Além disso, a dança parece ter efeitos positivos sobre o estado de ansiedade e depressão desta população. Um dos potenciais mecanismos através dos quais a dança exerce seus efeitos no SNC é através do aumento dos níveis de BDNF. Nossos resultados também mostraram que a Dança não alterou os parâmetros gliais (GFAP e S100B), metabólicos (CT, TG, GLI) e imunoendocrinológicos (PCR e cortisol) nos indivíduos com LM.
- Os efeitos do exercício forçado sobre os astrócitos hipocâmpais (diminuição da GFAP e aumento da GS), em condições fisiológicas, parecem ser mediados pela corticosterona. Podemos inferir, então, que baixos níveis de estresse podem estimular mecanismos de plasticidade no SNC.
- Em situações de lesão do SNC, principalmente aquelas que envolvem alterações neuroimunológicas, o exercício em esteira parece prevenir os danos evocados pelo processo inflamatório. O modelo experimental de administração de LPS sistêmico induziu resposta inflamatória no hipocampo dos ratos, demonstrada pelo aumento dos níveis de TNF- α . O mecanismo pelo qual o exercício em esteira previne os efeitos inflamatórios parece ser mediado pela proteína S100B, demonstrando a importância da participação dos astrócitos nos mecanismos de proteção do SNC, e a relevância da atividade física para prevenção de doenças

ou transtornos neurais. Além disso, parece que a administração sistêmica de LPS não afeta a memória de reconhecimento de objetos nos ratos Wistar.

- Os efeitos do exercício voluntário sobre os astrócitos hipocampais (aumento da GS), em condições fisiológicas, parecem ser mediados pelo BDNF, uma vez que esta neurotrofina está aumentada no hipocampo dos animais e está relacionada com mecanismos de plasticidade no SNC.

Desta forma, o uso do exercício físico e da dança mostrou-se potencialmente seguro e benéfico como medida preventiva ou como uma terapia de reabilitação físico-motora em indivíduos com alterações inflamatórias no SNC. Além disso, este trabalho contribuiu para elucidar alguns dos mecanismos através dos quais o exercício modula o funcionamento do SNC, sendo um passo importante para guiar a escolha do tipo de exercício a ser praticado/utilizado conforme o objetivo a ser alcançado.

Colocamos como perspectivas futuras:

- Analisar o efeito do exercício sobre outros fatores neurotróficos como por exemplo o GDNF, em modelo experimental.
- Analisar os níveis de TNF- α no soro dos pacientes com LM que participaram da intervenção com dança, bem como analisar os resultados obtidos a partir da aplicação de um questionário de avaliação da qualidade de vida (SF-36) que foi aplicado a esta população. Estas análises já estão em andamento.
- Analisar todos os parâmetros bioquímicos gliais, metabólicos, neuroimunoendócrinos e comportamentais em indivíduos com LM que não praticaram a atividade de dança (realizaram apenas o tratamento fisioterapêutico), configurando as análises do grupo controle. As amostras da primeira avaliação já estão armazenadas à -80°C e serão analisadas no decorrer deste ano. As amostras da segunda avaliação serão coletadas neste mês, porém, até o fechamento desta Tese elas ainda não estavam disponíveis sendo este o motivo pelo qual o grupo controle não foi incluído no artigo 4. Entretanto, após as mensurações bioquímicas destas amostras, o artigo 4 será concluído, incluindo-se o grupo controle nas análises estatísticas.

REFERÊNCIAS

1998. The World Health Organization Quality of Life Assessment (WHOQOL): development and general psychometric properties. *Soc Sci Med.* 46, 1569-85.
- Aad, G., et al., 2010. Observation of a centrality-dependent dijet asymmetry in lead-lead collisions at $\sqrt{s(NN)} = 2.76$ TeV with the ATLAS detector at the LHC. *Phys Rev Lett.* 105, 252303.
- Abbott, N.J., Ronnback, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 7, 41-53.
- Ada, L., et al., 2003. A treadmill and overground walking program improves walking in persons residing in the community after stroke: a placebo-controlled, randomized trial. *Arch Phys Med Rehabil.* 84, 1486-91.
- Aguilar, J., et al., 2010. Spinal cord injury immediately changes the state of the brain. *J Neurosci.* 30, 7528-37.
- Agulhon, C., et al., 2008. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron.* 59, 932-46.
- Akiyama, H., et al., 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 21, 383-421.
- Aktas, G., Ogce, F., 2005. Dance as a therapy for cancer prevention. *Asian Pac J Cancer Prev.* 6, 408-11.
- Aldridge, D., et al., 2005. Functionality or aesthetics? A pilot study of music therapy in the treatment of multiple sclerosis patients. *Complement Ther Med.* 13, 25-33.
- Allen, A., Messier, C., 2012. Plastic changes in the astrocyte GLUT1 glucose transporter and beta-tubulin microtubule protein following voluntary exercise in mice. *Behav Brain Res.* 240C, 95-102.
- Alpert, P.T., et al., 2009. The effect of modified jazz dance on balance, cognition, and mood in older adults. *J Am Acad Nurse Pract.* 21, 108-15.
- Ambrosini, E., Aloisi, F., 2004. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res.* 29, 1017-38.
- Anderson, B.J., et al., 2000. Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiol Behav.* 70, 425-9.
- Anderson, C.J., et al., 2009. Anxiety and depression in children and adolescents with spinal cord injuries. *Dev Med Child Neurol.* 51, 826-32.
- Anderson, D.N., 2001. Treating depression in old age: the reasons to be positive. *Age Ageing.* 30, 13-7.
- Anderson, R.E., et al., 2001. High serum S100B levels for trauma patients without head injuries. *Neurosurgery.* 48, 1255-8; discussion 1258-60.
- Ang, E.T., et al., 2004. Cytokine changes in the horizontal diagonal band of Broca in the septum after running and stroke: a correlation to glial activation. *Neuroscience.* 129, 337-47.
- Ang, E.T., et al., 2006. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res.* 1113, 186-93.
- Ang, E.T., Gomez-Pinilla, F., 2007. Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Curr Med Chem.* 14, 2564-71.
- Applegate, T.J., Angel, R., Classen, H.L., 2003. Effect of dietary calcium, 25-hydroxycholecalciferol, or bird strain on small intestinal phytase activity in broiler chickens. *Poult Sci.* 82, 1140-8.
- Arai, H., et al., 2004. Neurotoxic effects of lipopolysaccharide on nigral dopaminergic neurons are mediated by microglial activation, interleukin-1beta, and expression of caspase-11 in mice. *J Biol Chem.* 279, 51647-53.
- Arai, K., et al., 2001. Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice. *Jpn J Pharmacol.* 87, 195-201.

- Araque, A., et al., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208-15.
- Araque, A., Navarrete, M., 2010. Glial cells in neuronal network function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365, 2375-81.
- Aras, R., Barron, A.M., Pike, C.J., 2012. Caspase activation contributes to astrogliosis. *Brain Res.* 1450, 102-15.
- Arida, R.M., et al., 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.
- Arida, R.M., et al., 2007. Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 31, 814-22.
- Armstrong, E.J., Morrow, D.A., Sabatine, M.S., 2006. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: part II: acute-phase reactants and biomarkers of endothelial cell activation. *Circulation.* 113, e152-5.
- Asch, D.A., Jedrzejewski, M.K., Christakis, N.A., 1997. Response rates to mail surveys published in medical journals. *J Clin Epidemiol.* 50, 1129-36.
- Auld, D.S., Robitaille, R., 2003. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron.* 40, 389-400.
- Bagby, G.J., et al., 1994. Prior exercise suppresses the plasma tumor necrosis factor response to bacterial lipopolysaccharide. *J Appl Physiol.* 77, 1542-7.
- Bak, L.K., Schousboe, A., Waagepetersen, H.S., 2006. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem.* 98, 641-53.
- Bampi, L.N., Guilhem, D., Alves, E.D., 2010. Social model: a new approach of the disability theme. *Rev Lat Am Enfermagem.* 18, 816-23.
- Barry, C.E., et al., 2005. Activation of c-Jun-N-terminal kinase is critical in mediating lipopolysaccharide-induced changes in the rat hippocampus. *J Neurochem.* 93, 221-31.
- Behrman, A.L., Harkema, S.J., 2000. Locomotor training after human spinal cord injury: a series of case studies. *Phys Ther.* 80, 688-700.
- Belanger, M., Magistretti, P.J., 2009. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci.* 11, 281-95.
- Belarbi, K., et al., 2012. TNF-alpha protein synthesis inhibitor restores neuronal function and reverses cognitive deficits induced by chronic neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 9, 23.
- Belardinelli, R., et al., 2008. Waltz dancing in patients with chronic heart failure: new form of exercise training. *Circ Heart Fail.* 1, 107-14.
- Berchtold, N.C., et al., 2005. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 133, 853-61.
- Bezzi, P., et al., 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature.* 391, 281-5.
- Blustein, J.E., McLaughlin, M., Hoffman, J.R., 2006. Exercise effects stress-induced analgesia and spatial learning in rats. *Physiol Behav.* 89, 582-6.
- Bluthe, R.M., Dantzer, R., Kelley, K.W., 1992. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Res.* 573, 318-20.
- Bracchi-Ricard, V., et al., 2008. Astroglial nuclear factor-kappaB regulates learning and memory and synaptic plasticity in female mice. *J Neurochem.* 104, 611-23.
- Brahmachari, S., Fung, Y.K., Pahan, K., 2006. Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci.* 26, 4930-9.
- Bravo, G., et al., 2004. Cardiovascular alterations after spinal cord injury: an overview. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 2, 133-48.

- Briones, T.L., 2006. Environment, physical activity, and neurogenesis: implications for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 3, 49-54.
- Brown, G.C., 2007. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: iNOS and NADPH oxidase. *Biochem Soc Trans.* 35, 1119-21.
- Buckelew, S.P., et al., 1998. Biofeedback/relaxation training and exercise interventions for fibromyalgia: a prospective trial. *Arthritis Care Res.* 11, 196-209.
- Buehner, J.J., et al., 2012. Relationship between ASIA examination and functional outcomes in the NeuroRecovery Network Locomotor Training Program. *Arch Phys Med Rehabil.* 93, 1530-40.
- Burghardt, P.R., et al., 2004. The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain Res.* 1019, 84-96.
- Butt, A.M., Kalsi, A., 2006. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med.* 10, 33-44.
- Butterworth, R.F., 2010. Altered glial-neuronal crosstalk: cornerstone in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Int.* 57, 383-8.
- Buttini, M., Boddeke, H., 1995. Peripheral lipopolysaccharide stimulation induces interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain microglial cells. *Neuroscience.* 65, 523-30.
- Caldani, M., et al., 1982. Glutamine synthetase activity during mouse brain development. *Experientia.* 38, 1199-202.
- Carpentier, P.A., Duncan, D.S., Miller, S.D., 2008. Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun.* 22, 140-7.
- Carro, E., et al., 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.
- Castren, E., 2004. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. *Curr Opin Pharmacol.* 4, 58-64.
- Castren, E., 2005. Is mood chemistry? *Nat Rev Neurosci.* 6, 241-6.
- Cechetti, F., et al., 2007. Effect of treadmill exercise on cell damage in rat hippocampal slices submitted to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res.* 1157, 121-5.
- Cechetti, F., et al., 2008. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain Res.* 1188, 182-8.
- Cechetti, F., et al., 2012. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol Learn Mem.* 97, 90-6.
- Chaouloff, F., 1994. Influence of physical exercise on 5-HT_{1A} receptor- and anxiety-related behaviours. *Neurosci Lett.* 176, 226-30.
- Chaouloff, F., 1997. Effects of acute physical exercise on central serotonergic systems. *Med Sci Sports Exerc.* 29, 58-62.
- Chen, C.J., Liao, S.L., Kuo, J.S., 2000. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *J Neurochem.* 75, 1557-65.
- Chen, H., Weber, A.J., 2002. Expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase by Muller cells after optic nerve damage and intravitreal application of brain-derived neurotrophic factor. *Glia.* 38, 115-25.
- Chen, W.Q., et al., 2007. Hippocampal signaling cascades are modulated in voluntary and treadmill exercise rats. *Electrophoresis.* 28, 4392-400.
- Chen, Y., Swanson, R.A., 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23, 137-49.
- Chevront, S.N., et al., 2008. Serum S-100beta response to exercise-heat strain before and after acclimation. *Med Sci Sports Exerc.* 40, 1477-82.
- Cho, H.J., et al., 1998. Changes in brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity in rat dorsal root ganglia, spinal cord, and gracile nuclei following cut or crush injuries. *Exp Neurol.* 154, 224-30.

- Chodzko-Zajko, W.J., Moore, K.A., 1994. Physical fitness and cognitive functioning in aging. *Exerc Sport Sci Rev.* 22, 195-220.
- Choi, S.H., et al., 2008. Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. *Neuron.* 59, 568-80.
- Christianson, S.A., 1992. Emotional stress and eyewitness memory: a critical review. *Psychol Bull.* 112, 284-309.
- Chung, D.W., et al., 2010. Systemic administration of lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 immunoreactivity in endothelium and increases microglia in the mouse hippocampus. *Cell Mol Neurobiol.* 30, 531-41.
- Clark, P.J., et al., 2008. Intact neurogenesis is required for benefits of exercise on spatial memory but not motor performance or contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. *Neuroscience.* 155, 1048-58.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295-301.
- Cotman, C.W., Berchtold, N.C., Christie, L.A., 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30, 464-72.
- Craig, A.R., Hancock, K.M., Dickson, H.G., 1994. A longitudinal investigation into anxiety and depression in the first 2 years following a spinal cord injury. *Paraplegia.* 32, 675-9.
- Cruse, J.M., et al., 2000. Facilitation of immune function, healing of pressure ulcers, and nutritional status in spinal cord injury patients. *Exp Mol Pathol.* 68, 38-54.
- Cunnane, S., et al., 2011. Brain fuel metabolism, aging, and Alzheimer's disease. *Nutrition.* 27, 3-20.
- Cunningham, L.A., Su, C., 2002. Astrocyte delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in a mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 174, 230-42.
- Czapski, G.A., et al., 2004. Inhibition of nitric oxide synthase prevents energy failure and oxidative damage evoked in the brain by lipopolysaccharide. *Pol J Pharmacol.* 56, 643-6.
- Czapski, G.A., et al., 2006. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibition protects the brain against systemic inflammation. *Neurochem Int.* 49, 751-5.
- Czapski, G.A., et al., 2007. Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation. *J Neurosci Res.* 85, 1694-703.
- Czapski, G.A., Gajkowska, B., Strosznajder, J.B., 2010. Systemic administration of lipopolysaccharide induces molecular and morphological alterations in the hippocampus. *Brain Res.* 1356, 85-94.
- Dai, M., Xia, X.B., Xiong, S.Q., 2012. BDNF regulates GLAST and glutamine synthetase in mouse retinal Muller cells. *J Cell Physiol.* 227, 596-603.
- Dantzer, R., 2001. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci.* 933, 222-34.
- Datta, S., et al., 2009. A multivariate examination of temporal changes in Berg Balance Scale items for patients with ASIA Impairment Scale C and D spinal cord injuries. *Arch Phys Med Rehabil.* 90, 1208-17.
- Davies, K.M., Heaney, R.P., Rafferty, K., 2002. Decline in muscle mass with age in women: a longitudinal study using an indirect measure. *Metabolism.* 51, 935-9.
- De Filippis, D., et al., 2011. Cannabidiol reduces intestinal inflammation through the control of neuroimmune axis. *PLoS One.* 6, e28159.
- de Groot, P.C., et al., 2003. Effect of training intensity on physical capacity, lipid profile and insulin sensitivity in early rehabilitation of spinal cord injured individuals. *Spinal Cord.* 41, 673-9.
- De Keyser, J., Mostert, J.P., Koch, M.W., 2008. Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci.* 267, 3-16.

- de Senna, P.N., et al., 2011. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab Brain Dis.* 26, 269-79.
- DeVivo, M.J., et al., 1989. Cause of death for patients with spinal cord injuries. *Arch Intern Med.* 149, 1761-6.
- Dietrich Mde, O., Souza, D.O., Portela, L.V., 2004. Serum S100B protein: what does it mean during exercise? *Clin J Sport Med.* 14, 368; author reply 368-9.
- Dietrich, M.O., et al., 2003. Increase in serum S100B protein level after a swimming race. *Can J Appl Physiol.* 28, 710-6.
- Dik, M.G., et al., 2005. Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons. *Neurology.* 64, 1371-7.
- Ding, Y.H., et al., 2004. Exercise-induced overexpression of angiogenic factors and reduction of ischemia/reperfusion injury in stroke. *Curr Neurovasc Res.* 1, 411-20.
- Ding, Y.H., et al., 2005. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion. *Acta Neuropathol.* 109, 237-46.
- Ding, Y.H., et al., 2006. Exercise preconditioning reduces brain damage and inhibits TNF-alpha receptor expression after hypoxia/reoxygenation: an in vivo and in vitro study. *Curr Neurovasc Res.* 3, 263-71.
- Dishman, R.K., 1997. Brain monoamines, exercise, and behavioral stress: animal models. *Med Sci Sports Exerc.* 29, 63-74.
- Ditor, D.S., et al., 2003. Maintenance of exercise participation in individuals with spinal cord injury: effects on quality of life, stress and pain. *Spinal Cord.* 41, 446-50.
- Donato, R., 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 33, 637-68.
- Donato, R., 2003. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech.* 60, 540-51.
- Donato, R., et al., 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta.* 1793, 1008-22.
- Donato, R., Heizmann, C.W., 2010. S100B Protein in the Nervous System and Cardiovascular Apparatus in Normal and Pathological Conditions. *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2010, 929712.
- Dong, Y., Benveniste, E.N., 2001. Immune function of astrocytes. *Glia.* 36, 180-90.
- Dreyfus, C.F., et al., 1999. Expression of neurotrophins in the adult spinal cord in vivo. *J Neurosci Res.* 56, 1-7.
- Dringen, R., Pfeiffer, B., Hamprecht, B., 1999. Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci.* 19, 562-9.
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol.* 62, 649-71.
- Duman, R.S., 2005. Neurotrophic factors and regulation of mood: role of exercise, diet and metabolism. *Neurobiol Aging.* 26 Suppl 1, 88-93.
- Duman, R.S., Monteggia, L.M., 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* 59, 1116-27.
- Duran, F.S., et al., 2001. Effects of an exercise program on the rehabilitation of patients with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 82, 1349-54.
- E, L., et al., 2013. Effect of exercise on mouse liver and brain bioenergetic infrastructures. *Exp Physiol.* 98, 207-19.
- Earhart, G.M., 2009. Dance as therapy for individuals with Parkinson disease. *Eur J Phys Rehabil Med.* 45, 231-8.
- Eddleston, M., Mucke, L., 1993. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.* 54, 15-36.
- Eggermont, L., et al., 2006. Exercise, cognition and Alzheimer's disease: more is not necessarily better. *Neurosci Biobehav Rev.* 30, 562-75.

- Ehninger, D., Kempermann, G., 2003. Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cereb Cortex*. 13, 845-51.
- Ekdahl, C.T., et al., 2003. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 13632-7.
- Elkabes, S., Peng, L., Black, I.B., 1998. Lipopolysaccharide differentially regulates microglial trk receptor and neurotrophin expression. *J Neurosci Res*. 54, 117-22.
- Elliott, T.R., Frank, R.G., 1996. Depression following spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 77, 816-23.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*. 25, 1439-51.
- Erickson, K.I., et al., 2007. Interactive effects of fitness and hormone treatment on brain health in postmenopausal women. *Neurobiol Aging*. 28, 179-85.
- Ettinger, W.H., Jr., et al., 1997. A randomized trial comparing aerobic exercise and resistance exercise with a health education program in older adults with knee osteoarthritis. The Fitness Arthritis and Seniors Trial (FAST). *JAMA*. 277, 25-31.
- Eyre, H., Baune, B.T., 2012. Neuroimmunological effects of physical exercise in depression. *Brain Behav Immun*. 26, 251-66.
- Farina, C., Aloisi, F., Meini, E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 28, 138-45.
- Farmer, J., et al., 2004. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience*. 124, 71-9.
- Ferreira, A.F., et al., 2011. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, BDNF-independent hippocampal plasticity. *Brain Res*. 1425, 111-22.
- Ferry, B., McGaugh, J.L., 2000. Role of amygdala norepinephrine in mediating stress hormone regulation of memory storage. *Acta Pharmacol Sin*. 21, 481-93.
- Fiacco, T.A., McCarthy, K.D., 2004. Intracellular astrocyte calcium waves in situ increase the frequency of spontaneous AMPA receptor currents in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*. 24, 722-32.
- Fillit, H., et al., 1991. Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 129, 318-20.
- Fischer-Smith, T., et al., 2004. Macrophage/microglial accumulation and proliferating cell nuclear antigen expression in the central nervous system in human immunodeficiency virus encephalopathy. *Am J Pathol*. 164, 2089-99.
- Forrest, G.F., et al., 2012. Ambulation and balance outcomes measure different aspects of recovery in individuals with chronic, incomplete spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 93, 1553-64.
- Frost, F., et al., 2005. Inflammatory C-reactive protein and cytokine levels in asymptomatic people with chronic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 86, 312-7.
- Fuhrer, M.J., et al., 1993. Depressive symptomatology in persons with spinal cord injury who reside in the community. *Arch Phys Med Rehabil*. 74, 255-60.
- Fuller, S., Munch, G., Steele, M., 2009. Activated astrocytes: a therapeutic target in Alzheimer's disease? *Expert Rev Neurother*. 9, 1585-94.
- Fuller, S., Steele, M., Munch, G., 2010. Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease--do they neglect their neurosupportive roles? *Mutat Res*. 690, 40-9.
- Fumagalli, F., et al., 2009. Acute spinal cord injury reduces brain derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. *Neuroscience*. 159, 936-9.
- Fuss, J., et al., 2010. Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus*. 20, 364-76.

- Gaillard, P.J., et al., 2001. Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Eur J Pharm Sci.* 12, 215-22.
- Gaillard, P.J., de Boer, A.B., Breimer, D.D., 2003. Pharmacological investigations on lipopolysaccharide-induced permeability changes in the blood-brain barrier in vitro. *Microvasc Res.* 65, 24-31.
- Gao, H.M., et al., 2003. Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. *FASEB J.* 17, 1957-9.
- Garcia-Capdevila, S., et al., 2009. Effects of long-term voluntary exercise on learning and memory processes: dependency of the task and level of exercise. *Behav Brain Res.* 202, 162-70.
- Gee, J.R., Keller, J.N., 2005. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *Int J Biochem Cell Biol.* 37, 1145-50.
- Gibbs, M.E., Hutchinson, D., Hertz, L., 2008. Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev.* 32, 927-44.
- Goekint, M., et al., 2011. Influence of citalopram and environmental temperature on exercise-induced changes in BDNF. *Neurosci Lett.* 494, 150-4.
- Gomez-Pinilla, F., et al., 2002. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *J Neurophysiol.* 88, 2187-95.
- Gomez-Pinilla, F., et al., 2004. Afferent input modulates neurotrophins and synaptic plasticity in the spinal cord. *J Neurophysiol.* 92, 3423-32.
- Gomez-Pinilla, F., Vaynman, S., Ying, Z., 2008. Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. *Eur J Neurosci.* 28, 2278-87.
- Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Zhuang, Y., 2012. Brain and spinal cord interaction: protective effects of exercise prior to spinal cord injury. *PLoS One.* 7, e32298.
- Goncalves, C.A., Leite, M.C., Nardin, P., 2008. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem.* 41, 755-63.
- Gonzalez, A., Salido, G.M., 2009. Ethanol alters the physiology of neuron-glia communication. *Int Rev Neurobiol.* 88, 167-98.
- Goodwin, M.L., 2010. Blood glucose regulation during prolonged, submaximal, continuous exercise: a guide for clinicians. *J Diabetes Sci Technol.* 4, 694-705.
- Gordon, G.R., Mulligan, S.J., MacVicar, B.A., 2007. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia.* 55, 1214-21.
- Gorina, R., et al., 2009. Astrocytes are very sensitive to develop innate immune responses to lipid-carried short interfering RNA. *Glia.* 57, 93-107.
- Gould, E., et al., 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci.* 17, 2492-8.
- Grahn, J.A., Brett, M., 2007. Rhythm and beat perception in motor areas of the brain. *J Cogn Neurosci.* 19, 893-906.
- Granger, C.V., et al., 1993. Performance profiles of the functional independence measure. *Am J Phys Med Rehabil.* 72, 84-9.
- Greenwood, B.N., et al., 2003. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci.* 23, 2889-98.
- Greenwood, B.N., Fleshner, M., 2008. Exercise, learned helplessness, and the stress-resistant brain. *Neuromolecular Med.* 10, 81-98.
- Guan, Z., Fang, J., 2006. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav Immun.* 20, 64-71.
- Hackney, M.E., et al., 2007. Effects of tango on functional mobility in Parkinson's disease: a preliminary study. *J Neurol Phys Ther.* 31, 173-9.

- Hackney, M.E., Earhart, G.M., 2009. Effects of dance on movement control in Parkinson's disease: a comparison of Argentine tango and American ballroom. *J Rehabil Med.* 41, 475-81.
- Hackney, M.E., Earhart, G.M., 2010a. Effects of dance on gait and balance in Parkinson's disease: a comparison of partnered and nonpartnered dance movement. *Neurorehabil Neural Repair.* 24, 384-92.
- Hackney, M.E., Earhart, G.M., 2010b. Effects of dance on balance and gait in severe Parkinson disease: a case study. *Disabil Rehabil.* 32, 679-84.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Haydon, P.G., 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med.* 13, 54-63.
- Halonen, S.K., et al., 2006. Microarray analysis of IFN-gamma response genes in astrocytes. *J Neuroimmunol.* 175, 19-30.
- Hamburg, J., Clair, A.A., 2003. The effects of a movement with music program on measures of balance and gait speed in healthy older adults. *J Music Ther.* 40, 212-26.
- Hanisch, U.K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 40, 140-55.
- Hanna, J.L., 1995. The power of dance: health and healing. *J Altern Complement Med.* 1, 323-31.
- Hasselblatt, M., et al., 2004. Serum S100beta increases in marathon runners reflect extracranial release rather than glial damage. *Neurology.* 62, 1634-6.
- Hauss-Wegrzyniak, B., et al., 1998. Brain inflammatory response induced by intracerebroventricular infusion of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study. *Brain Res.* 794, 211-24.
- Hauss-Wegrzyniak, B., Vannucchi, M.G., Wenk, G.L., 2000. Behavioral and ultrastructural changes induced by chronic neuroinflammation in young rats. *Brain Res.* 859, 157-66.
- Hawkins, B.T., Davis, T.P., 2005. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 57, 173-85.
- Haydon, P.G., et al., 2009. Astrocytic control of synaptic transmission and plasticity: a target for drugs of abuse? *Neuropharmacology.* 56 Suppl 1, 83-90.
- Hayes, K., et al., 2008. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol.* 115, 289-96.
- Hayes, K.C., et al., 2002. Elevated serum titers of proinflammatory cytokines and CNS autoantibodies in patients with chronic spinal cord injury. *J Neurotrauma.* 19, 753-61.
- Hennigan, A., Trotter, C., Kelly, A.M., 2007. Lipopolysaccharide impairs long-term potentiation and recognition memory and increases p75NTR expression in the rat dentate gyrus. *Brain Res.* 1130, 158-66.
- Henry, C.J., et al., 2008. Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. *J Neuroinflammation.* 5, 15.
- Hensley, K., et al., 1995. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem.* 65, 2146-56.
- Hicks, A.L., et al., 2003. Long-term exercise training in persons with spinal cord injury: effects on strength, arm ergometry performance and psychological well-being. *Spinal Cord.* 41, 34-43.
- Hirokawa, E., 2004. Effects of music listening and relaxation instructions on arousal changes and the working memory task in older adults. *J Music Ther.* 41, 107-27.
- Hirrlinger, J., Dringen, R., 2010. The cytosolic redox state of astrocytes: Maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking. *Brain Res Rev.* 63, 177-88.
- Hochweller, K., Anderton, S.M., 2005. Kinetics of costimulatory molecule expression by T cells and dendritic cells during the induction of tolerance versus immunity in vivo. *Eur J Immunol.* 35, 1086-96.
- Hokkanen, L., et al., 2008. Dance and movement therapeutic methods in management of dementia: a randomized, controlled study. *J Am Geriatr Soc.* 56, 771-2.

- Holmes, C., et al., 2003. Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 74, 788-9.
- Huang, A.M., et al., 2006. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J Neural Transm*. 113, 803-11.
- Huttunen, H.J., et al., 2000. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem*. 275, 40096-105.
- Iadecola, C., Nedergaard, M., 2007. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. 10, 1369-76.
- Jacewicz, M., et al., 2009. Systemic administration of lipopolysaccharide impairs glutathione redox state and object recognition in male mice. The effect of PARP-1 inhibitor. *Folia Neuropathol*. 47, 321-8.
- Jafarian-Tehrani, M., Sternberg, E.M., 1999. Animal models of neuroimmune interactions in inflammatory diseases. *J Neuroimmunol*. 100, 13-20.
- Jakeman, L.B., et al., 1998. Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 154, 170-84.
- Jeong, Y.J., et al., 2005. Dance movement therapy improves emotional responses and modulates neurohormones in adolescents with mild depression. *Int J Neurosci*. 115, 1711-20.
- Kalpakjian, C.Z., et al., 2009. Association of daily stressors and salivary cortisol in spinal cord injury. *Rehabil Psychol*. 54, 288-98.
- Ke, Z., et al., 2011. The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PLoS One*. 6, e16643.
- Keith, R.A., et al., 1987. The functional independence measure: a new tool for rehabilitation. *Adv Clin Rehabil*. 1, 6-18.
- Kelley, K.W., et al., 2003. Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun*. 17 Suppl 1, S112-8.
- Kelly, A., Laroche, S., Davis, S., 2003a. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci*. 23, 5354-60.
- Kelly, A., et al., 2003b. Activation of p38 plays a pivotal role in the inhibitory effect of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta on long term potentiation in rat dentate gyrus. *J Biol Chem*. 278, 19453-62.
- Kent, S., et al., 1996. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 20, 171-5.
- Keogh, J.W., et al., 2009. Physical benefits of dancing for healthy older adults: a review. *J Aging Phys Act*. 17, 479-500.
- Khabour, O.F., et al., 2010. Changes in spatial memory and BDNF expression to concurrent dietary restriction and voluntary exercise. *Hippocampus*. 20, 637-45.
- Kil, K., et al., 1999. T cell responses to myelin basic protein in patients with spinal cord injury and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 98, 201-7.
- Kim, C.G., June, K.J., Song, R., 2003. Effects of a health-promotion program on cardiovascular risk factors, health behaviors, and life satisfaction in institutionalized elderly women. *Int J Nurs Stud*. 40, 375-81.
- Kinni, H., et al., 2011. Cerebral metabolism after forced or voluntary physical exercise. *Brain Res*. 1388, 48-55.
- Kitamura, T., Mishina, M., Sugiyama, H., 2003. Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Neurosci Res*. 47, 55-63.
- Kleim, J.A., Cooper, N.R., VandenBerg, P.M., 2002. Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. *Brain Res*. 934, 1-6.

- Kleindienst, A., et al., 2005. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 22, 645-55.
- Kleindienst, A., Ross Bullock, M., 2006. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma*. 23, 1185-200.
- Kogel, D., et al., 2004. S100B potently activates p65/c-Rel transcriptional complexes in hippocampal neurons: Clinical implications for the role of S100B in excitotoxic brain injury. *Neuroscience*. 127, 913-20.
- Koliatsos, V.E., et al., 1993. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron*. 10, 359-67.
- Komitova, M., et al., 2006. Enriched environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive polydendrocytes in adult rat neocortex. *Exp Neurol*. 199, 113-21.
- Konsman, J.P., et al., 2000. The vagus nerve mediates behavioural depression, but not fever, in response to peripheral immune signals; a functional anatomical analysis. *Eur J Neurosci*. 12, 4434-46.
- Kosenko, E., et al., 2003. Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide. *Neurochem Int*. 43, 493-9.
- Kraus, W.E., et al., 2002. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med*. 347, 1483-92.
- Krause, J.S., Kemp, B., Coker, J., 2000. Depression after spinal cord injury: relation to gender, ethnicity, aging, and socioeconomic indicators. *Arch Phys Med Rehabil*. 81, 1099-109.
- Krause, J.S., Saladin, L.K., Adkins, R.H., 2009. Disparities in subjective well-being, participation, and health after spinal cord injury: a 6-year longitudinal study. *NeuroRehabilitation*. 24, 47-56.
- Kronenberg, G., et al., 2007. Local origin and activity-dependent generation of nestin-expressing protoplasmic astrocytes in CA1. *Brain Struct Funct*. 212, 19-35.
- Kuchibhotla, K.V., et al., 2009. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science*. 323, 1211-5.
- Kudlacek, S., et al., 1997. The impact of a senior dancing program on spinal and peripheral bone mass. *Am J Phys Med Rehabil*. 76, 477-81.
- Kwon, B.K., et al., 2009. Intrathecal pressure monitoring and cerebrospinal fluid drainage in acute spinal cord injury: a prospective randomized trial. *J Neurosurg Spine*. 10, 181-93.
- Lam, A.G., et al., 2001. Mechanism of glial activation by S100B: involvement of the transcription factor NFkappaB. *Neurobiol Aging*. 22, 765-72.
- Lange-Asschenfeldt, C., Kojda, G., 2008. Alzheimer's disease, cerebrovascular dysfunction and the benefits of exercise: from vessels to neurons. *Exp Gerontol*. 43, 499-504.
- Laping, N.J., et al., 1994. Transcriptional control of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in vivo shows opposite responses to corticosterone in the hippocampus. *Endocrinology*. 135, 1928-33.
- Lau, B.Y., et al., 2011. Increased synapsin expression and neurite sprouting in lamprey brain after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 228, 283-93.
- Laurin, D., et al., 2001. Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol*. 58, 498-504.
- Lavis, T.D., Scelza, W.M., Bockenek, W.L., 2007. Cardiovascular health and fitness in persons with spinal cord injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 18, 317-31, vii.
- Le Prince, G., et al., 1995. Glutamine synthetase (GS) expression is reduced in senile dementia of the Alzheimer type. *Neurochem Res*. 20, 859-62.
- Leasure, J.L., Jones, M., 2008. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience*. 156, 456-65.

- Lee, B., Nantais, T., 1996. Use of electronic music as an occupational therapy modality in spinal cord injury rehabilitation: an occupational performance model. *Am J Occup Ther.* 50, 362-9.
- Lee, J.W., et al., 2008. Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation.* 5, 37.
- Lee, S.C., et al., 1993. Macrophage colony-stimulating factor in human fetal astrocytes and microglia. Differential regulation by cytokines and lipopolysaccharide, and modulation of class II MHC on microglia. *J Immunol.* 150, 594-604.
- Lee, Y., et al., 2007. Glia mechanisms in mood regulation: a novel model of mood disorders. *Psychopharmacology (Berl).* 191, 55-65.
- Leem, Y.H., et al., 2011. Chronic exercise ameliorates the neuroinflammation in mice carrying NSE/htau23. *Biochem Biophys Res Commun.* 406, 359-65.
- Leis, J.A., Bekar, L.K., Walz, W., 2005. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia.* 50, 407-16.
- Leite, M.C., et al., 2008. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *J Neurosci Methods.* 169, 93-9.
- Lemay, J.F., Nadeau, S., 2010. Standing balance assessment in ASIA D paraplegic and tetraplegic participants: concurrent validity of the Berg Balance Scale. *Spinal Cord.* 48, 245-50.
- Leon, A.S., Sanchez, O.A., 2001. Response of blood lipids to exercise training alone or combined with dietary intervention. *Med Sci Sports Exerc.* 33, S502-15; discussion S528-9.
- Leste, A., Rust, J., 1984. Effects of dance on anxiety. *Percept Mot Skills.* 58, 767-72.
- Letournel-Boulland, M.L., et al., 1994. Lipopolysaccharides (LPS), up-regulate the IL-1-mRNA and down-regulate the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase (GS)-mRNAs in astroglial primary cultures. *Eur Cytokine Netw.* 5, 51-6.
- Li, J., et al., 2005. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. *Neurosci Lett.* 386, 160-4.
- Li, R., et al., 2004. Tumor necrosis factor death receptor signaling cascade is required for amyloid-beta protein-induced neuron death. *J Neurosci.* 24, 1760-71.
- Li, Y., et al., 1998. S100 beta increases levels of beta-amyloid precursor protein and its encoding mRNA in rat neuronal cultures. *J Neurochem.* 71, 1421-8.
- Liao, C.K., et al., 2010. Lipopolysaccharide-induced inhibition of connexin43 gap junction communication in astrocytes is mediated by downregulation of caveolin-3. *Int J Biochem Cell Biol.* 42, 762-70.
- Lie, D.C., et al., 2004. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44, 399-421.
- Lin, K.H., et al., 1997. Quality of life of spinal cord injured patients in Taiwan: a subgroup study. *Spinal Cord.* 35, 841-9.
- Lista, I., Sorrentino, G., 2010. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. *Cell Mol Neurobiol.* 30, 493-503.
- Liu, X., et al., 2010. Swimming exercise effects on the expression of HSP70 and iNOS in hippocampus and prefrontal cortex in combined stress. *Neurosci Lett.* 476, 99-103.
- Liu, Y.F., et al., 2008. Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 90, 81-9.
- Lovatel, G.A., et al., 2012. Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function. *Neurobiol Learn Mem.* 98, 182-7.
- Lox, C.L., McAuley, E., Tucker, R.S., 1996. Physical Training Effects on Acute Exercise-induced Feeling States in HIV- 1-positive Individuals. *J Health Psychol.* 1, 235-40.

- Lucas, S.M., Rothwell, N.J., Gibson, R.M., 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 147 Suppl 1, S232-40.
- Luo, K.R., et al., 2010. Differential regulation of neurotrophin S100B and BDNF in two rat models of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 34, 1433-9.
- Ma, Q., 2008. Beneficial effects of moderate voluntary physical exercise and its biological mechanisms on brain health. *Neurosci Bull.* 24, 265-70.
- Manns, P.J., McCubbin, J.A., Williams, D.P., 2005. Fitness, inflammation, and the metabolic syndrome in men with paraplegia. *Arch Phys Med Rehabil.* 86, 1176-81.
- Marchi, N., et al., 2004. Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clin Chim Acta.* 342, 1-12.
- Marino, R.J., et al., 2003. International standards for neurological classification of spinal cord injury. *J Spinal Cord Med.* 26 Suppl 1, S50-6.
- Marino, R.J., Graves, D.E., 2004. Metric properties of the ASIA motor score: subscales improve correlation with functional activities. *Arch Phys Med Rehabil.* 85, 1804-10.
- Mark, K.S., Miller, D.W., 1999. Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF-alpha exposure. *Life Sci.* 64, 1941-53.
- Matute, C., et al., 2002. Excitotoxicity in glial cells. *Eur J Pharmacol.* 447, 239-46.
- Maynard, F.M., Jr., et al., 1997. International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury. American Spinal Injury Association. *Spinal Cord.* 35, 266-74.
- McAfoose, J., Baune, B.T., 2009. Evidence for a cytokine model of cognitive function. *Neurosci Biobehav Rev.* 33, 355-66.
- McColl, M.A., Skinner, H., 1995. Assessing inter- and intrapersonal resources: social support and coping among adults with a disability. *Disabil Rehabil.* 17, 24-34.
- McEwen, B.S., 2000. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. *Prog Brain Res.* 122, 25-34.
- McGeer, E.G., McGeer, P.L., 1998. The importance of inflammatory mechanisms in Alzheimer disease. *Exp Gerontol.* 33, 371-8.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 2004. Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci.* 1035, 104-16.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G., 2008. Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 23, 474-83.
- McNally, L., Bhagwagar, Z., Hannestad, J., 2008. Inflammation, glutamate, and glia in depression: a literature review. *CNS Spectr.* 13, 501-10.
- Mello e Souza, T., et al., 2000. S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiol Behav.* 71, 29-33.
- Menet, V., et al., 2001. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. *J Neurosci.* 21, 6147-58.
- Mhatre, M., Floyd, R.A., Hensley, K., 2004. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets. *J Alzheimers Dis.* 6, 147-57.
- Midha, M., Schmitt, J.K., Sclater, M., 1999. Exercise effect with the wheelchair aerobic fitness trainer on conditioning and metabolic function in disabled persons: a pilot study. *Arch Phys Med Rehabil.* 80, 258-61.
- Miles, C., Hardman, E., 1998. State-dependent memory produced by aerobic exercise. *Ergonomics.* 41, 20-8.
- Minghetti, L., 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 63, 901-10.

- Mitterauer, B.J., 2010. The syncytiopathy hypothesis of depression: downregulation of glial connexins may protract synaptic information processing and cause memory impairment. *Med Hypotheses*. 74, 497-502.
- Miwa, M., et al., 2011. Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter 2. *J Neuroinflammation*. 8, 153.
- Miwa, T., et al., 1997. Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J Neurosci Res*. 50, 1023-9.
- Moffet, H., et al., 2000. Feasibility of an eight-week dance-based exercise program and its effects on locomotor ability of persons with functional class III rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res*. 13, 100-11.
- Monje, M.L., Toda, H., Palmer, T.D., 2003. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 302, 1760-5.
- Montazeri, A., et al., 2003. The Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS): translation and validation study of the Iranian version. *Health Qual Life Outcomes*. 1, 14.
- Moraska, A., et al., 2000. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279, R1321-9.
- Mota, B.C., et al., 2012. Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation and protects against toxicity induced by traumatic brain injury: behavioral and neurochemical approach. *Neurotox Res*. 21, 175-84.
- Muller, A.P., et al., 2011. Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus*. 21, 1082-92.
- Muraki, S., et al., 2000. The effect of frequency and mode of sports activity on the psychological status in tetraplegics and paraplegics. *Spinal Cord*. 38, 309-14.
- Murrock, C.J., Higgins, P.A., Killion, C., 2009. Dance and peer support to improve diabetes outcomes in African American women. *Diabetes Educ*. 35, 995-1003.
- Mussi, R.K., et al., 2008. Exercise training reduces pulmonary ischaemia-reperfusion-induced inflammatory responses. *Eur Respir J*. 31, 645-9.
- Nakahara, Y., Gage, F.H., Tuszynski, M.H., 1996. Grafts of fibroblasts genetically modified to secrete NGF, BDNF, NT-3, or basic FGF elicit differential responses in the adult spinal cord. *Cell Transplant*. 5, 191-204.
- Narath, E., Skalicky, M., Viidik, A., 2001. Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of ageing male rats differently. *Exp Gerontol*. 36, 1699-711.
- Navarrete, M., Araque, A., 2008. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*. 57, 883-93.
- Naylor, A.S., et al., 2005. Extended voluntary running inhibits exercise-induced adult hippocampal progenitor proliferation in the spontaneously hypertensive rat. *J Neurophysiol*. 93, 2406-14.
- Neeper, S.A., et al., 1996. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain Res*. 726, 49-56.
- Netto, C.B., et al., 2006. Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res*. 37, 683-6.
- Newman, E.A., 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci*. 26, 536-42.
- Nichol, K.E., Parachikova, A.I., Cotman, C.W., 2007. Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. *Behav Brain Res*. 184, 124-32.
- Nichol, K.E., et al., 2008. Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. *J Neuroinflammation*. 5, 13.

- Nichols, N.R., et al., 2005. Glucocorticoid regulation of glial responses during hippocampal neurodegeneration and regeneration. *Brain Res Brain Res Rev.* 48, 287-301.
- Nishi, M., Kawata, M., Azmitia, E.C., 2000. Trophic interactions between brain-derived neurotrophic factor and s100beta on cultured serotonergic neurons. *Brain Res.* 868, 113-8.
- Nithianantharajah, J., Hannan, A.J., 2009. The neurobiology of brain and cognitive reserve: mental and physical activity as modulators of brain disorders. *Prog Neurobiol.* 89, 369-82.
- Nolan, Y., et al., 2003. Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. *Exp Neurol.* 184, 794-804.
- 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.
- Ogonovszky, H., et al., 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.
- Ohtaki, N., et al., 2007. Downregulation of an astrocyte-derived inflammatory protein, S100B, reduces vascular inflammatory responses in brains persistently infected with Borna disease virus. *J Virol.* 81, 5940-8.
- Oliff, H.S., et al., 1998. Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res.* 61, 147-53.
- Otto, M., et al., 2000. Boxing and running lead to a rise in serum levels of S-100B protein. *Int J Sports Med.* 21, 551-5.
- Ozaki, H., et al., 1999. Cutting edge: combined treatment of TNF-alpha and IFN-gamma causes redistribution of junctional adhesion molecule in human endothelial cells. *J Immunol.* 163, 553-7.
- Pacchetti, C., et al., 2000. Active music therapy in Parkinson's disease: an integrative method for motor and emotional rehabilitation. *Psychosom Med.* 62, 386-93.
- Palo-Bengtsson, L., Winblad, B., Ekman, S.L., 1998. Social dancing: a way to support intellectual, emotional and motor functions in persons with dementia. *J Psychiatr Ment Health Nurs.* 5, 545-54.
- Pan, W., et al., 2008. Neuroinflammation facilitates LIF entry into brain: role of TNF. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294, C1436-42.
- Panickar, K.S., Norenberg, M.D., 2005. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia.* 50, 287-98.
- Parachikova, A., Nichol, K.E., Cotman, C.W., 2008. Short-term exercise in aged Tg2576 mice alters neuroinflammation and improves cognition. *Neurobiol Dis.* 30, 121-9.
- Patel, A.J., et al., 1982. The activities in different neural cell types of certain enzymes associated with the metabolic compartmentation glutamate. *Brain Res.* 256, 3-11.
- Pekny, M., Pekna, M., 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol.* 204, 428-37.
- Pekny, M., Nilsson, M., 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 50, 427-34.
- Perea, G., Araque, A., 2005. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J Neurosci.* 25, 2192-203.
- Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 32, 421-31.
- Perea, G., Araque, A., 2010. GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res Rev.* 63, 93-102.
- Petrova, P., et al., 2003. MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci.* 20, 173-88.
- Petrova, P.S., et al., 2004. Discovering novel phenotype-selective neurotrophic factors to treat neurodegenerative diseases. *Prog Brain Res.* 146, 168-83.

- Phillis, J.W., Horrocks, L.A., Farooqui, A.A., 2006. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev.* 52, 201-43.
- Ploughman, M., et al., 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.
- Quan, N., He, L., Lai, W., 2003. Endothelial activation is an intermediate step for peripheral lipopolysaccharide induced activation of paraventricular nucleus. *Brain Res Bull.* 59, 447-52.
- Querido, J.S., Sheel, A.W., 2007. Regulation of cerebral blood flow during exercise. *Sports Med.* 37, 765-82.
- Quincozes-Santos, A., Gottfried, C., 2011. Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1215, 72-8.
- Radak, Z., et al., 2006. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem Int.* 49, 387-92.
- Rasmussen, P., et al., 2009. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol.* 94, 1062-9.
- Reali, C., et al., 2005. S100b counteracts effects of the neurotoxicant trimethyltin on astrocytes and microglia. *J Neurosci Res.* 81, 677-86.
- Redila, V.A., Christie, B.R., 2006. Exercise-induced changes in dendritic structure and complexity in the adult hippocampal dentate gyrus. *Neuroscience.* 137, 1299-307.
- Reyes, R.C., Parpura, V., 2008. Models of astrocytic Ca dynamics and epilepsy. *Drug Discov Today Dis Models.* 5, 13-18.
- Rickmann, M., Wolff, J.R., Meyer, D.L., 1995. Expression of S100 protein in the vestibular nuclei during compensation of unilateral labyrinthectomy symptoms. *Brain Res.* 688, 8-14.
- Rimmer, J.H., Braddock, D., Pitetti, K.H., 1996. Research on physical activity and disability: an emerging national priority. *Med Sci Sports Exerc.* 28, 1366-72.
- Robinson, S.R., 2001. Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res.* 66, 972-80.
- Rodrigues, L., et al., 2010. Treadmill training restores spatial cognitive deficits and neurochemical alterations in the hippocampus of rats submitted to an intracerebroventricular administration of streptozotocin. *J Neural Transm.* 117, 1295-305.
- Rojas Vega, S., et al., 2008. Impact of exercise on neuroplasticity-related proteins in spinal cord injured humans. *Neuroscience.* 153, 1064-70.
- Rossi, D., Volterra, A., 2009. Astrocytic dysfunction: insights on the role in neurodegeneration. *Brain Res Bull.* 80, 224-32.
- Rothermundt, M., et al., 2001. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. *Mol Psychiatry.* 6, 445-9.
- Rothermundt, M., et al., 2003. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech.* 60, 614-32.
- Rothstein, J.D., et al., 1996. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 16, 675-86.
- Rozovsky, I., et al., 2002. Estradiol (E2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin. *Endocrinology.* 143, 636-46.
- Sackett, D.L., 1989. Rules of evidence and clinical recommendations on the use of antithrombotic agents. *Chest.* 95, 2S-4S.
- Sadowsky, C.L., McDonald, J.W., 2009. Activity-based restorative therapies: concepts and applications in spinal cord injury-related neurorehabilitation. *Dev Disabil Res Rev.* 15, 112-6.

- Salim, S., et al., 2010. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav Brain Res.* 208, 545-52.
- Sandhu, J.K., et al., 2009. Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. *Neurobiol Dis.* 33, 405-14.
- Santiago, M.C., Coyle, C.P., Kinney, W.B., 1993. Aerobic exercise effect on individuals with physical disabilities. *Arch Phys Med Rehabil.* 74, 1192-8.
- Santin, K., et al., 2011. Moderate exercise training and chronic caloric restriction modulate redox status in rat hippocampus. *Brain Res.* 1421, 1-10.
- Schabitz, W.R., et al., 2004. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke.* 35, 992-7.
- Schnell, L., et al., 1994. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature.* 367, 170-3.
- Schnydrig, S., et al., 2007. Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affects expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotropin and proopiomelanocortin in mouse brain. *Neurosci Lett.* 429, 69-73.
- Schroeter, M.L., et al., 2008. Serum markers support disease-specific glial pathology in major depression. *J Affect Disord.* 111, 271-80.
- Schulpis, K.H., et al., 2007. The effect of alpha-Tocopherol supplementation on training-induced elevation of S100B protein in sera of basketball players. *Clin Biochem.* 40, 900-6.
- Schulte-Herbruggen, O., et al., 2008. Distinct regulation of brain-derived neurotrophic factor and noradrenaline in S100B knockout mice. *Neurosci Lett.* 442, 100-3.
- Scopel, D., et al., 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res Bull.* 71, 155-9.
- Segal, J.L., Brunnemann, S.R., 1993. Circulating levels of soluble interleukin 2 receptors are elevated in the sera of humans with spinal cord injury. *J Am Paraplegia Soc.* 16, 30-3.
- Segal, J.L., et al., 1997. Circulating levels of IL-2R, ICAM-1, and IL-6 in spinal cord injuries. *Arch Phys Med Rehabil.* 78, 44-7.
- Seifert, G., Schilling, K., Steinhauser, C., 2006. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci.* 7, 194-206.
- Seifert, G., Carmignoto, G., Steinhauser, C., 2010. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res Rev.* 63, 212-21.
- Shaw, K.N., Commins, S., O'Mara, S.M., 2001. Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the watermaze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus. *Behav Brain Res.* 124, 47-54.
- Shimizu, E., et al., 2003. Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry.* 54, 70-5.
- Silver, J., Miller, J.H., 2004. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 5, 146-56.
- Simard, M., Nedergaard, M., 2004. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience.* 129, 877-96.
- Smith, A.D., Zigmond, M.J., 2003. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Exp Neurol.* 184, 31-9.
- Smith, C.D., et al., 1991. Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 10540-3.
- Smith, C.M., et al., 2011. Autophagy in acute brain injury: feast, famine, or folly? *Neurobiol Dis.* 43, 52-9.
- Sofroniew, M.V., 2005. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 11, 400-7.
- Sofroniew, M.V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32, 638-47.

- Sousa e Silva, T., et al., 2010. Prolonged physical training decreases mRNA levels of glucocorticoid receptor and inflammatory genes. *Horm Res Paediatr.* 74, 6-14.
- Soya, H., et al., 2007. BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun.* 358, 961-7.
- Sparkman, N.L., et al., 2005. Bacterial endotoxin-induced behavioral alterations in two variations of the Morris water maze. *Physiol Behav.* 86, 244-51.
- Stalnacke, B.M., Tegner, Y., Sojka, P., 2003. Playing ice hockey and basketball increases serum levels of S-100B in elite players: a pilot study. *Clin J Sport Med.* 13, 292-302.
- Stalnacke, B.M., Tegner, Y., Sojka, P., 2004. Playing soccer increases serum concentrations of the biochemical markers of brain damage S-100B and neuron-specific enolase in elite players: a pilot study. *Brain Inj.* 18, 899-909.
- Stiens, S.A., Bergman, S.B., Formal, C.S., 1997. Spinal cord injury rehabilitation. 4. Individual experience, personal adaptation, and social perspectives. *Arch Phys Med Rehabil.* 78, S65-72.
- Struder, H.K., Weicker, H., 2001. Physiology and pathophysiology of the serotonergic system and its implications on mental and physical performance. Part I. *Int J Sports Med.* 22, 467-81.
- Stummer, W., et al., 1994. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke.* 25, 1862-9.
- Suarez, I., Bodega, G., Fernandez, B., 2002. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. *Neurochem Int.* 41, 123-42.
- Sung, Y.H., et al., 2012. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice. *Life Sci.* 91, 1309-16.
- Tanaka, H., et al., 2002. Disturbance of hippocampal long-term potentiation after transient ischemia in GFAP deficient mice. *J Neurosci Res.* 67, 11-20.
- Tanaka, Y., et al., 2010. Exhaustive exercise reduces tumor necrosis factor- α production in response to lipopolysaccharide in mice. *Neuroimmunomodulation.* 17, 279-86.
- Theodosis, D.T., Poulain, D.A., Oliet, S.H., 2008. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev.* 88, 983-1008.
- Tokes, T., et al., 2011. Protective effects of a phosphatidylcholine-enriched diet in lipopolysaccharide-induced experimental neuroinflammation in the rat. *Shock.* 36, 458-65.
- Tramontina, F., et al., 2002. Developmental changes in S100B content in brain tissue, cerebrospinal fluid, and astrocyte cultures of rats. *Cell Mol Neurobiol.* 22, 373-8.
- Tramontina, F., et al., 2006. Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol.* 26, 81-6.
- Tramontina, F., et al., 2007. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *J Neurosci Methods.* 162, 282-6.
- Trendelenburg, G., 2008. Acute neurodegeneration and the inflammasome: central processor for danger signals and the inflammatory response? *J Cereb Blood Flow Metab.* 28, 867-81.
- Tsacopoulos, M., Magistretti, P.J., 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci.* 16, 877-85.
- Uda, M., et al., 2006. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. *Brain Res.* 1104, 64-72.
- Van Eldik, L.J., Wainwright, M.S., 2003. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci.* 21, 97-108.
- van Hall, G., et al., 2009. Blood lactate is an important energy source for the human brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 29, 1121-9.
- van Noort, J.M., Bsibsi, M., 2009. Toll-like receptors in the CNS: implications for neurodegeneration and repair. *Prog Brain Res.* 175, 139-48.

- van Praag, H., et al., 1999a. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 13427-31.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F.H., 1999b. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 2, 266-70.
- van Praag, H., et al., 2005. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci.* 25, 8680-5.
- van Praag, H., 2008. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Med.* 10, 128-40.
- van Praag, H., 2009. Exercise and the brain: something to chew on. *Trends Neurosci.* 32, 283-90.
- Varady, K.A., Jones, P.J., 2005. Combination diet and exercise interventions for the treatment of dyslipidemia: an effective preliminary strategy to lower cholesterol levels? *J Nutr.* 135, 1829-35.
- Vardimon, L., 2000. Neuroprotection by glutamine synthetase. *Isr Med Assoc J.* 2 Suppl, 46-51.
- Vargas, D.L., et al., 2005. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol.* 57, 67-81.
- Vaynman, S., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2004. Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. *J Neurosci Res.* 76, 356-62.
- Vereker, E., et al., 2000. Lipopolysaccharide inhibits long term potentiation in the rat dentate gyrus by activating caspase-1. *J Biol Chem.* 275, 26252-8.
- Vergara, D., et al., 2010. IFN-beta reverses the lipopolysaccharide-induced proteome modifications in treated astrocytes. *J Neuroimmunol.* 221, 115-20.
- Viola, G.G., et al., 2009. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res.* 1274, 47-54.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10, 45-65.
- Wang, D.D., Bordey, A., 2008. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol.* 86, 342-67.
- Wang, T.D., et al., 2007. Circulating levels of markers of inflammation and endothelial activation are increased in men with chronic spinal cord injury. *J Formos Med Assoc.* 106, 919-28.
- Waters, R.L., et al., 1991. Profiles of spinal cord injury and recovery after gunshot injury. *Clin Orthop Relat Res.* 14-21.
- Werme, M., et al., 2002. Running increases ethanol preference. *Behav Brain Res.* 133, 301-8.
- Whitaker-Azmitia, P.M., et al., 1997. Transgenic mice overexpressing the neurotrophic factor S-100 beta show neuronal cytoskeletal and behavioral signs of altered aging processes: implications for Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Brain Res.* 776, 51-60.
- Williams, B.C., et al., 1997. Predicting patient scores between the functional independence measure and the minimum data set: development and performance of a FIM-MDS "crosswalk". *Arch Phys Med Rehabil.* 78, 48-54.
- Williamson, L.L., Chao, A., Bilbo, S.D., 2012. Environmental enrichment alters glial antigen expression and neuroimmune function in the adult rat hippocampus. *Brain Behav Immun.* 26, 500-10.
- Willoughby, J.O., et al., 2003. Fluorocitrate-mediated astroglial dysfunction causes seizures. *J Neurosci Res.* 74, 160-6.
- Wirz, M., Muller, R., Bastiaenen, C., 2010. Falls in persons with spinal cord injury: validity and reliability of the Berg Balance Scale. *Neurorehabil Neural Repair.* 24, 70-7.
- Woertgen, C., et al., 2002. Does bungee jumping release S-100B protein? *J Clin Neurosci.* 9, 51-2.
- Wu, C.W., et al., 2007. Treadmill exercise counteracts the suppressive effects of peripheral lipopolysaccharide on hippocampal neurogenesis and learning and memory. *J Neurochem.* 103, 2471-81.

- Xaio, H., et al., 2001. Effect of LPS on the permeability of the blood-brain barrier to insulin. *Brain Res.* 896, 36-42.
- Yan, S.S., et al., 2003. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nat Med.* 9, 287-93.
- Yang, Y.R., et al., 2003. Treadmill training effects on neurological outcome after middle cerebral artery occlusion in rats. *Can J Neurol Sci.* 30, 252-8.
- Ye, Y., et al., 2011. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression. *Neurosci Lett.* 503, 15-9.
- Yekutieli, M., et al., 1989. The prevalence of hypertension, ischaemic heart disease and diabetes in traumatic spinal cord injured patients and amputees. *Paraplegia.* 27, 58-62.
- Yirmiya, R., Goshen, I., 2011. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain Behav Immun.* 25, 181-213.
- Yuan, G., Al-Shali, K.Z., Hegele, R.A., 2007. Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ.* 176, 1113-20.
- Zhao, C., et al., 2007. TNF-alpha knockout and minocycline treatment attenuates blood-brain barrier leakage in MPTP-treated mice. *Neurobiol Dis.* 26, 36-46.
- Ziv, Y., et al., 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci.* 9, 268-75.
- Zou, J., et al., 2010. Glutamine synthetase down-regulation reduces astrocyte protection against glutamate excitotoxicity to neurons. *Neurochem Int.* 56, 577-84.
- Zou, J., et al., 2011. Down-regulation of glutamine synthetase enhances migration of rat astrocytes after in vitro injury. *Neurochem Int.* 58, 404-13.