

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARINA PACHECO LEARDINI TRISTÃO

**Efeitos neuroprotetores e microcirculatórios do treinamento físico em ratos
com hipoperfusão cerebral crônica e a investigação dos inibidores da
fosfodiesterase sobre a função mitocondrial e estresse oxidativo em um
modelo de isquemia-reperfusão do membro inferior**

RIO DE JANEIRO

2019

MARINA PACHECO LEARDINI TRISTÃO

EFEITOS NEUROPROTETORES E MICROCIRCULATÓRIOS DO
TREINAMENTO FÍSICO EM RATOS COM HIPOPERFUSÃO CEREBRAL
CRÔNICA E A INVESTIGAÇÃO DOS INIBIDORES DA
FOSFODIESTERASE SOBRE A FUNÇÃO MITOCONDRIAL E ESTRESSE
OXIDATIVO EM UM MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO DO
MEMBRO INFERIOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biologia Celular e
Molecular do Instituto Oswaldo Cruz
para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Orientadores: Dra. Vanessa Estato e Dr.
Eduardo Tibiriçá

RIO DE JANEIRO

2019

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARINA PACHECO LEARDINI TRISTÃO

Efeitos neuroprotetores e microcirculatórios do treinamento físico em ratos com hipoperfusão cerebral crônica e a investigação dos inibidores da fosfodiesterase sobre a função mitocondrial e estresse oxidativo em um modelo de isquemia-reperfusão do membro inferior

Orientadores: Dra. Vanessa Estato e Dr. Eduardo Tibiriçá

EXAMINADORES:

Dr. Daniel Pedra Adesse (IOC-FIOCRUZ)

Dr. Antonio Claudio Lucas da Nóbrega (UFF)

Dr. Paulo de Tarso Veras Farinatti (UERJ)

Dra. Luciana Lopes de Almeida Ribeiro Garzoni (IOC-FIOCRUZ)

Dra. Cristiane Matsuura (UERJ)

Dra. Juliana Borges (UERJ)

RIO DE JANEIRO

2019

iii

FICHA CATALOGÁFICA

Pacheco Leardini Tristão, Marina.

Efeitos neuroprotetores e microcirculatórios do treinamento físico em ratos com hipoperfusão cerebral crônica e a investigação dos inibidores da fosfodiesterase sobre a função mitocondrial e estresse oxidativo em um modelo de isquemia-reperfusão do membro inferior / Marina Pacheco Leardini Tristão. - Rio de Janeiro, 2019.

134 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Vanessa Estado.

Co-orientador: Eduardo Tibiriçá.

Bibliografia: f. 89-101

1. hipoperfusão cerebral crônica. 2. treinamento físico. 3. microcirculação cerebral. 4. isquemia-reperfusão. 5. disfunção mitocondrial.
I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

À minha vovó Lili.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre colocar pessoas tão boas no meu caminho.

Aos animais utilizados neste trabalho.

Aos meus pais, Antonio e Irene, e a minha irmã Cecília por todo apoio, compreensão e amor.

A minha orientadora Vanessa Estato que encarou o desafio de uma nova linha de pesquisa, dedicando-se imensamente ao longo deste trabalho, principalmente na imunohistoquímica. Obrigada pelas palavras de incentivo e a amizade!

Ao meu orientador Eduardo Tibiriçá pela oportunidade de trabalhar em uma das maiores instituições de pesquisa do país. Obrigada por todo aprendizado, paciência e confiança nesta linha de pesquisa.

Ao professor Bernard Geny, pela orientação e aprendizado durante o doutorado sanduíche. E, aos amigos do laboratório de Strasbourg que fizeram a minha estadia mais feliz.

Ao professor Bousquet e família que me acolheram durante o período em Strasbourg.

As alunas de Iniciação Científica, Giulia Andrade e Letícia Marques, que muito nos ajudaram na realização do projeto.

Ao Laboratório de Investigação Cardiovascular que durante seis anos fez parte da minha vida científica.

A equipe do Laboratório de Imunofarmacologia pela receptividade e ajuda nos experimentos. A Rose, nossa querida secretária, por todo cuidado e atenção. E ao Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto, por todas as discussões de resultados e sugestões.

Ao Laboratório de Biologia das Células Gliais da UFRJ pela colaboração nos experimentos de imunohistoquímica. E também a plataforma de Microscopia Confocal do IOC-FIOCRUZ.

A equipe do biotério Ozório de Almeida por todo cuidado para com os animais.

Aos funcionários do pavilhão Ozório de Almeida, 108 e da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular.

Aos membros da banca por aceitarem o convite.

As agências de fomento à pesquisa, CNPq e CAPES, que financiaram o desenvolvimento deste projeto e, que eu torço e luto para que resistam aos que tentam acabar com a Ciência, Ensino e Pesquisa no Brasil.

Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino.

(Paulo Freire)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	VIII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	XV
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	XVII
PARTE I.....	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Cognição e demência	2
1.2 O modelo experimental de hipoperfusão cerebral crônica	4
1.3 O modelo de hipoperfusão cerebral crônica e o dano cognitivo	5
1.4 Efeitos da hipoperfusão cerebral crônica e as alterações hemodinâmicas periféricas e cerebrais	6
1.5 Neuroinflamação	9
1.6 Intervenção terapêutica com o exercício físico	11
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. HIPÓTESE DE TRABALHO.....	13
4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo Geral	14
4.2 Objetivos específicos	14
5. MATERIAIS E MÉTODOS	15
5.1 Animais	15
5.2 Desenho experimental da padronização do modelo de hipoperfusão cerebral e comparação com animais idosos	15
5.3 Desenho experimental do tratamento com exercício físico no modelo de hipoperfusão cerebral crônica	16
5.4 Procedimento cirúrgico para o modelo de hipoperfusão cerebral por oclusão bilateral das carótidas comuns (2VO).....	17
5.5 Medidas hemodinâmicas.....	18

5.6	Teste incremental máximo e protocolo de treinamento físico	19
5.7	Teste de Campo Aberto (open field test)	20
5.8	Microscopia Intravital Cerebral por Epi-Iluminação e Fluorescência.....	21
5.8.1	Análise da densidade capilar funcional (DCF)	22
5.8.2	Avaliação da interação leucócito-endotélio.....	23
5.9	Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral por fluxometria microvascular à laser	24
5.10	Avaliação do conteúdo proteico por Western blot	25
5.11	Análise imuno-histoquímica	26
5.12	Análise estatística	28
6.	RESULTADOS	29
6.1	A hipoperfusão cerebral aguda e crônica induziu rarefação capilar e aumento de rolamento de leucócitos no cérebro.....	29
6.2	A redução do fluxo sanguíneo cortical em animais idosos é semelhante à hipoperfusão cerebral aguda e crônica	31
6.3	Exercício físico por 12 semanas reduziu a pressão arterial sistólica em animais com hipoperfusão cerebral crônica e sedentários	32
6.4	O desempenho físico não foi alterado em ratos submetidos à hipoperfusão cerebral crônica	34
6.5	O exercício físico moderado durante 12 semanas foi capaz de melhorar a memória de habituação no teste de campo aberto	35
6.6	O exercício físico moderado foi capaz de normalizar a densidade capilar funcional e reduzir o rolamento de leucócitos no cérebro	37
6.7	O exercício físico moderado não induziu alterações no fluxo sanguíneo microvascular cerebral	38
6.8	O exercício físico por 12 semanas altera a expressão de proteínas sinápticas.....	39
6.9	O exercício físico precoce melhora a cobertura de astrócitos sobre os vasos do córtex cerebral de animais submetidos ao modelo de hipoperfusão cerebral crônica	41
6.10	O exercício físico não altera a cobertura de astrócitos sobre os vasos do hipocampo de animais submetidos ao modelo de hipoperfusão cerebral crônica	43
6.11	O exercício físico protege a ativação microglial no hipocampo de animais submetidos ao modelo de hipoperfusão cerebral crônica	45
7.	DISCUSSÃO	48
8.	CONCLUSÃO	56
PARTE II	57	
9.	INTRODUÇÃO.....	58
9.1	Doença arterial periférica: efeitos no músculo esquelético e no cérebro	58

9.2 Lesão de reperfusão e suas consequências musculares e cerebrais	59
9.3 Mitocôndria, fosforilação oxidativa e os complexos mitocondriais	61
9.4 Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo no contexto da neurodegeneração	64
9.5 Intervenção terapêutica com inibidores da fosfodiesterase	66
10. HIPÓTESE DE TRABALHO.....	68
11. OBJETIVOS.....	68
11.1 Objetivo geral	68
11.2 Objetivos específicos	68
12. MATERIAIS E MÉTODOS	69
12.1 Animais	69
12.2 Modelo de isquemia-reperfusão do membro inferior e desenho experimental	69
12.3 Estudo da função mitocondrial.....	71
12.3.1 Permeabilização das fibras musculares e homogenato cerebral	71
12.3.2 Estudo da função de complexos da cadeia respiratória mitocondrial muscular e cerebral e acoplamento mitocondrial	72
12.4 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE).....	73
12.4.1 O ensaio de produção de EROs pela RPE	75
12.5 Análise estatística	76
13. RESULTADOS	77
13.1 Resultados no músculo esquelético	77
13.1.1 Os inibidores da fosfodiesterase não protegeram o músculo esquelético da disfunção mitocondrial após a isquemia-reperfusão.....	77
13.1.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético por RPE	78
13.2 Resultados no hipocampo	79
13.2.1 A isquemia-reperfusão do membro inferior não alterou a função mitocondrial no hipocampo	79
13.2.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio no hipocampo por RPE....	82
14. DISCUSSÃO.....	83
15. CONCLUSÃO.....	86
16. CONCLUSÃO GERAL	87
17. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	87

18. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:.....	88
19. REFERÊNCIAS	89
ANEXOS	102

APRESENTAÇÃO

Esta tese investigou em diferentes modelos experimentais, o comprometimento do sistema nervoso central decorrente de um dano central ou periférico. No mestrado, verificamos que o exercício físico por 7 dias e iniciado logo após a hipoperfusão cerebral foi capaz de reduzir a inflamação e o estresse oxidativo no cérebro. Agora no doutorado, investigamos se a manutenção do exercício físico por um período maior, 12 semanas, e iniciado logo após a hipoperfusão cerebral seria capaz de induzir efeitos não só na microcirculação cerebral, como também sobre as proteínas sinápticas, os astrócitos, as microglias e a função cognitiva (parte I).

Durante o doutorado, fui contemplada com uma bolsa de Doutorado Sanduíche por 6 meses (Programa de doutorado sanduíche no exterior PDSE-CAPES) na *Université de Strasbourg*, França no laboratório de *Mitochondrie, stress oxydant et protection musculaire*. Ao longo deste período, publicamos uma revisão de literatura sobre os efeitos do exercício físico e a função cognitiva na doença arterial periférica sugerindo o potencial envolvimento das miocinas e microglias neste contexto (anexo I). Além disso, investigamos o tratamento com os inibidores da fosfodiesterase em um modelo de doença arterial periférica, em relação à função mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio no hipocampo e no músculo esquelético (parte II).

A primeira parte da tese foi desenvolvida na Fundação Oswaldo Cruz no Laboratório de Investigação Cardiovascular (procedimento cirúrgico, exercício físico, microscopia intravital e fluxometria a laser), no Laboratório de Imunofarmacologia (análises biomoleculares e teste cognitivo) e em colaboração com o Laboratório de Biologia das Células Gliais da UFRJ (imuno-histoquímica) e com a Plataforma de Microscopia Confocal - FIOCRUZ, sob orientação do Dr. Eduardo Tibiriçá e da Dra. Vanessa Estado. A segunda etapa foi realizada durante o Doutorado Sanduíche no *Laboratoire de mitochondrie, stress oxydant et protection musculaire*, EA 3072 – Instituto de Fisiologia, Faculdade de Medicina, Strasbourg - França, sob orientação do Prof. Dr. Bernard Geny.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Efeitos neuroprotetores e microcirculatórios do treinamento físico em ratos com hipoperfusão cerebral crônica e a investigação dos inibidores da fosfodiesterase sobre a função mitocondrial e estresse oxidativo em um modelo de isquemia-reperfusão do membro inferior

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Marina Pacheco Leardini Tristão

Insultos isquêmicos que ocorrem no sistema nervoso central ou na periferia, podem desencadear alterações na microcirculação, estresse oxidativo e inflamação, fatores que podem contribuir para o comprometimento da função cognitiva. Neste trabalho, primeiramente, investigamos se os ratos submetidos ao modelo experimental de hipoperfusão cerebral por oclusão bilateral das carótidas comuns (2VO) apresentariam efeitos microcirculatórios e inflamatórios semelhantes ao observados em ratos idosos e também, se 12 semanas de treinamento físico moderado, seria capaz de promover proteção sobre as variáveis microcirculatórias, neuroinflamatórias e cognitivas. Como resultado, encontramos que a 2VO induziu rarefação capilar e aumento no rolamento de leucócitos cerebrais, nos animais sedentários após 24h, 72h e 12 semanas de hipoperfusão cerebral e o exercício físico foi capaz de preservar a densidade capilar funcional do córtex cerebral, reduzir o rolamento dos leucócitos à parede de vênulas cerebrais, aumentar o conteúdo protéico da sinaptofisina e do PSD-95, reduzir a ativação da microglia, aumentar os processos astrocíticos e melhora na memória de habituação. Concluímos nesta primeira etapa que as alterações microcirculatórias e inflamatórias cerebrais são desencadeadas na fase inicial da hipoperfusão cerebral e que a intervenção precoce do exercício físico na fase aguda da 2VO pode ser considerada uma abordagem preventiva para a demência vascular. Já na segunda etapa, investigamos o impacto da IR do membro inferior em camundongos sobre a função mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético e no hipocampo. Investigamos também se o tratamento com os inibidores da fosfodiesterase (PDE) 4 (rolipram) e 5 (sildenafil), 30 minutos antes da isquemia e 5 minutos antes da reperfusão, seriam capazes de reverter os danos mitocondriais e o estresse oxidativo tanto no músculo quanto no hipocampo. Observamos que a IR no membro inferior foi capaz de gerar disfunção mitocondrial e estresse oxidativo no músculo esquelético, não sendo acompanhada por alterações no hipocampo e que a administração dos inibidores da PDE não protegeu o tecido muscular da IR. Concluímos que a isquemia de 2h seguida por 2h de reperfusão no membro inferior induziu a curto prazo, danos no músculo esquelético não sendo acompanhada por danos no hipocampo. A administração dos inibidores da PDE apresentou efeitos distintos no hipocampo e no músculo esquelético.

Palavras-chaves: hipoperfusão cerebral crônica, treinamento físico, neuroproteção, microcirculação cerebral, isquemia-reperfusão, disfunção mitocondrial e inibidores da fosfodiesterase.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Effects of exercise training on neuroprotection and cerebral microcirculation in a model of chronic cerebral hypoperfusion in rats and the investigation of phosphodiesterase inhibitors on mitochondrial function and oxidative stress in a model of lower limb ischemia-reperfusion

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Marina Pacheco Leardini Tristão

Ischemic injury occurring in the central or peripheral nervous system can trigger the changes in microcirculation, oxidative stress and neuroinflammation, factors that may contribute to impairment of cognitive function. In the first part, we investigated whether the rats submitted to an experimental model of cerebral hypoperfusion by bilateral occlusion of common carotids (2VO) would present microcirculatory and inflammatory changes similar to observed in elderly rats and also if after 12 weeks of moderated physical exercise after 2VO, would be able to promote protection in microcirculatory and cognitive outcomes. As result, we found that 2VO was able to induce cortical capillary rarefaction and increase in rolling cerebral leukocyte in sedentary animals after 24h, 72h and 12 weeks of cerebral hypoperfusion. Physical exercise was able to preserve the functional capillary density, reduced rolling cerebral leukocytes in the venules, increase synaptic proteins, such as synaptophysin and PSD-95, reduce microglial activation, increase astrocytic processes and also improve memory habituation. We conclude that the microcirculatory and inflammatory changes in the brain are triggered in the acute phase of the cerebral hypoperfusion and that the early exercise training initiated in the acute phase of 2VO can be considered a preventive strategy against vascular dementia.

In the second study, we investigated the impact of lower limb IR model on mitochondrial function and production of reactive oxygen species in skeletal muscle and hippocampus of mice. We also investigated whether treatment with inhibitors of phosphodiesterase (PDE) 4 (rolipram) and 5 (sildenafil), 30 minutes prior to ischemia and 5 minutes before reperfusion would be able to reverse mitochondrial damage and oxidative stress in muscle and hippocampus. We observed that IR was able to induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle, not being accompanied by changes in the hippocampus and that the PDE inhibitors did not protect the muscle from IR injury. We conclude that 2h of ischemia followed by 2h of reperfusion in the lower limb caused short-term damage the skeletal muscle, however no damage to the hippocampus was detected. The administration of PDE inhibitors presented different effects in the hippocampus and skeletal muscle.

Key words: vascular dementia, exercise training, neuroprotection, cerebral microcirculation, ischemia-reperfusion, mitochondrial dysfunction and phosphodiesterase inhibitors.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Dinâmica do FSC no modelo 2VO	5
Figura 2: Microcirculação do cérebro humano.....	8
Figura 3: Desenho experimental para investigar os efeitos agudos e crônicos da hipoperfusão cerebral.....	16
Figura 4: Desenho experimental para investigar os efeitos do exercício físico	17
Figura 5: Imagem representativa do procedimento cirúrgico de oclusão bilateral das carótidas comuns em ratos	18
Figura 6: Aparelho utilizado para a medida da pressão arterial sistólica por pletismografia caudal.	19
Figura 7: Esteira de treinamento adaptada para ratos utilizada no trabalho.....	20
Figura 8: Desenho representativo da caixa do teste de campo aberto.	21
Figura 9: Microscopia intravital do córtex cerebral.....	22
Figura 10: Fotomicrografia representativa da microcirculação cerebral de rato Wistar Kyoto.....	23
Figura 11: Imagem representativa da microscopia intravital e da interação leucócito-endotélio vênular.....	24
Figura 12: Imagem ilustrativa da avaliação do fluxo sanguíneo cerebral através do laser Speckle	25
Figura 13: Densidade capilar funcional e interação leucócito-endotélio no córtex cerebral por microscopia intravital por epi-iluminação e fluorescência	30
Figura 14: Fluxo sanguíneo do córtex cerebral por laser speckle com contraste de imagem ..	31
Figura 15: Análise da pressão arterial por pletismografia caudal	33
Tabela 1: Parâmetros do teste incremental máximo.....	34
Figura 16: Análise da função cognitiva pelo teste de campo aberto	36
Figura 17: Análise da microcirculação do córtex cerebral pela microscopia intravital por epi-iluminação e fluorescência	38
Figura 18: Análise do fluxo sanguíneo do córtex cerebral por fluxometria a laser speckle com contraste de imagem	39

Figura 19: Western blot para sinaptofisina, PSD-95 e BDNF no hipocampo.....	40
Figura 20: Resultados dos vasos cobertos por astrócitos no córtex cerebral	42
Figura 21: Resultados dos vasos cobertos por astrócitos no hipocampo. respectivos controles (Sham Sed e Sham-Ex). Núcleo marcado com DAP (azul)	44
Figura 22: O exercício físico aumenta o número de microglias ramificadas no hipocampo ...	47
Figura 23: Ilustração dos complexos mitocondriais e da fosforilação oxidativa	64
Figura 24: Desenho experimental utilizado para investigar os efeitos dos inibidores da fosfodiesterase no modelo de isquemia-reperfusão do membro inferior em camundongos	70
Figura 25: Imagem representativa do protocolo de preparação para a função mitocondrial do músculo esquelético e do hipocampo	72
Figura 26: Funcionamento da ressonância paramagnética eletrônica - RPE.	75
Figura 1: Respiração mitocondrial do gastrocnêmio de camundongos após isquemia-reperfusão do membro inferior.....	78
Figura 2: Gráfico representativo da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por RPE no gastrocnêmio.....	79
Figura 29: Respiração mitocondrial do gastrocnêmio de camundongos após isquemia-reperfusão do membro inferior	81
Figura 30: Gráfico representativo da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por RPE no gastrocnêmio	82

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

2VO	oclusão de dois vasos, <i>two vessel occlusion</i>
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico
AVE	acidente vascular encefálico
BCCAO	oclusão bilateral das artérias carótidas comuns, <i>bilateral common carotid artery occlusion</i>
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	barreira hematoencefálica
DA	doença de Alzheimer
DAP	doença arterial periférica
DCF	densidade capilar funcional
DV	demência vascular
Elm	espaço intermembranas
EROs	espécies reativas de oxigênio
FSC	fluxo sanguíneo cerebral
GFAP	proteína glial fibrilar ácida
GMPc	monofosfato de guanosina cíclico
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
IR	isquemia-reperfusão
LPS	lipopolissacarídeo
LSCI	laser speckle com contraste de imagem
MEM	membrana externa mitocondrial
MIM	membrana interna mitocondrial
mPTP	poro de transio de permeabilidade mitocondrial
O⁻	ânion superóxido
PAS	pressão arterial sistólica
PCr	fosfocreatina
PDE	fosfodiesterase
PGC- 1α	coativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxisoma
SNC	sistema nervoso central

STE	sistema transportador de elétrons
TIM	teste incremental máximo
TNF-α	fator de necrose tumoral- α
VCAM-1	molécula de adesão celular vascular 1
βA	beta-amilóide
$\Delta\Psi_m$	potencial de membrana mitocondrial

PARTE I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cognição e demência

A função cognitiva pode ser definida como habilidades relacionadas ao conhecimento, envolvendo, por exemplo, a atenção e a **memória**. Conforme descreve Izquierdo (2011), memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações. A aquisição representa a aprendizagem; a formação e a conservação são processos complexos que dependem do tipo de memória; e, a evocação é a recordação, a lembrança de alguma informação que foi aprendida. *“Só lembramos aquilo que gravamos aquilo que foi aprendido”* (IZQUIERDO, 2011, p.11) (1).

As memórias podem ser classificadas de acordo com a função, conteúdo e **tempo**. Considerando o tempo que as memórias podem durar, existem as que permanecem alguns segundos-minutos, outras que duram algumas horas e outras que duram décadas. A primeira delas é memória de trabalho, que é utilizada para manter as informações por alguns segundos, no máximo poucos minutos. Serve para saber onde estamos ou o que estamos fazendo; permite-nos também dar continuidade a um diálogo, decorar um número por alguns segundos. A memória de trabalho gerencia as informações, determinando se é uma informação nova ou não, se é útil ou não para o indivíduo. O processamento desta memória depende fundamentalmente da atividade elétrica dos neurônios do córtex pré-frontal (1).

Já as memórias de curta e longa duração têm como objetivo “formar arquivos”. A memória de curta duração é a que dura entre 1 e 6 horas e a de longa duração pode ser lembrada por meses ou anos. No entanto, ambas dependem do **hipocampo** e áreas corticais, como pré-frontal e entorrinal. *“A memória de curta duração requer as mesmas estruturas nervosas que a de longa duração, mas envolve mecanismos próprios e distintos”* (IZQUIERDO, 2011, p.37)(1). São processos que correm paralelamente e independentes, ou seja, a memória de longa duração não depende da memória de curta duração para existir. Por exemplo, durante o envelhecimento normal, os idosos apresentam falhas na memória recente, mas conseguem se recordar de memórias mais antigas. Diferente do que ocorre durante em doenças neurodegenerativas (1).

Regiões como o córtex cerebral e o hipocampo desempenham papel importante nos processos de aprendizagem e memória e, quando sofrem danos isquêmicos e/ou traumáticos podem desencadear a perda da função cognitiva (2). A perda da função cognitiva está presente na demência, que é uma doença neurodegenerativa na qual o indivíduo apresenta, além do comprometimento progressivo da cognição, alterações comportamentais que podem ser precedidas e/ou acompanhadas pela perda de neurônios, neuroinflamação e estresse oxidativo, desencadeando impactos negativos nas atividades da vida diária e socioeconômicos, já que em longo prazo esses pacientes perdem a capacidade de exercerem as suas profissões (3, 4).

Estudos sobre o envelhecimento e desordens neurodegenerativas relacionadas com a idade, estão cada vez mais frequentes, devido ao aumento no número de casos destas doenças relacionadas ao envelhecimento cerebral. De acordo com dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 50 milhões de pessoas vivem com algum tipo de demência no mundo. No Brasil, entre 2000-2014, foi identificado que, em indivíduos com mais de 65 anos, a prevalência da demência varia entre 5,1% a 17,5% (5).

Distúrbios da circulação cerebral têm sido associados com o declínio da função cognitiva em idosos e com o desenvolvimento da demência. Em 2011 o *American Heart Association* e o *American Stroke Association* destacaram a importância das contribuições vasculares para o comprometimento cognitivo e demência, caracterizando e sugerindo o nome “demência vascular” (DV). A DV é a segunda demência mais comum depois da doença de Alzheimer (DA), representando, pelo menos, 20% dos casos no mundo e ambas ocasionam considerável ônus econômico/social (6). Sugere-se que uma das causas mais comuns para o desenvolvimento da DV seja a doença dos pequenos vasos cerebrais, que afeta arteríolas, vênulas e capilares cerebrais, levando à oclusão arteriolar, infartos lacunares (lesões menores de 1cm) e alterações da substância branca. Alterações no fluxo sanguíneo e na microcirculação cerebral podem estar relacionadas com distúrbios neurológicos, sendo a causa ou um fator coadjuvante para o seu desenvolvimento, ressaltando a ligação entre o sistema circulatório e o sistema nervoso central (SNC) (4, 6).

A hipoperfusão cerebral, ou seja, uma redução moderada e persistente do fluxo sanguíneo cerebral vem sendo sugerida pela literatura como um dos principais contribuintes para o declínio cognitivo e processos degenerativos que levam à demência. A redução na perfusão cerebral pode levar à diminuição da oferta de oxigênio e nutrientes em diversas áreas do cérebro, comprometendo a função sináptica e a integridade neuronal (7).

Além disso, a hipoperfusão cerebral global pode ocorrer durante o envelhecimento ou em pacientes que sofreram parada cardíaca ou submetidos à cirurgia cardíaca podendo desencadear o processo neurodegenerativo. Sendo assim, a redução moderada do FSC que ocorre durante o envelhecimento, por exemplo, é sugerida como um fator ou causa para o comprometimento cognitivo e desenvolvimento da demência (8, 9).

1.2 O modelo experimental de hipoperfusão cerebral crônica

Com o objetivo de estudar os mecanismos fisiopatológicos da hipoperfusão cerebral crônica que ocorre em pacientes com demência, fez-se necessário o estudo em modelos experimentais que reproduzissem o mesmo padrão de alterações microvasculares e inflamatórias observados em pacientes. A oclusão bilateral das carótidas comuns (*bilateral common carotid artery occlusion – BCCAO*) ou a oclusão de dois vasos (*two vessel occlusion -2VO*) em ratos é considerada um modelo adequado para estudos de DV, porque o círculo completo de Willis permite o fluxo sanguíneo, porém reduzido, após a manobra do 2VO em ratos. Em contraste, a falta ou o subdesenvolvimento das artérias comunicantes posteriores do círculo de Willis levam a isquemia grave durante o 2VO na maioria dos camundongos. Os ratos submetidos à hipoperfusão cerebral crônica não apresentam sinais de disfunção motora, convulsões ou lesão de reperfusão, como ocorre em modelos de AVE, nos quais se induz a isquemia focal com a oclusão da artéria cerebral média (10).

A hipoperfusão cerebral crônica induzida pelo modelo de 2VO pode ser dividida em três fases: aguda, crônica e de restituição ou recuperação. A primeira delas apresenta queda acentuada no FSC que persiste até o terceiro dia de isquemia, conduzindo um quadro de hipóxia-isquêmica. Nesta fase, os animais não apresentam dano cognitivo expressivo. Já na fase crônica, que pode permanecer entre a oitava e a décima segunda semana, é a que mais se assemelha à diminuição do FSC no envelhecimento humano e à demência. Nessa fase, o processo neurodegenerativo é mais extenso e, portanto, é a fase mais utilizada para o estudo da demência. Em seguida, a fase de restituição é descrita com o retorno aos valores basais do FSC, mas ainda se tenta estabelecer até quanto tempo após a cirurgia o déficit cognitivo permanece (10).

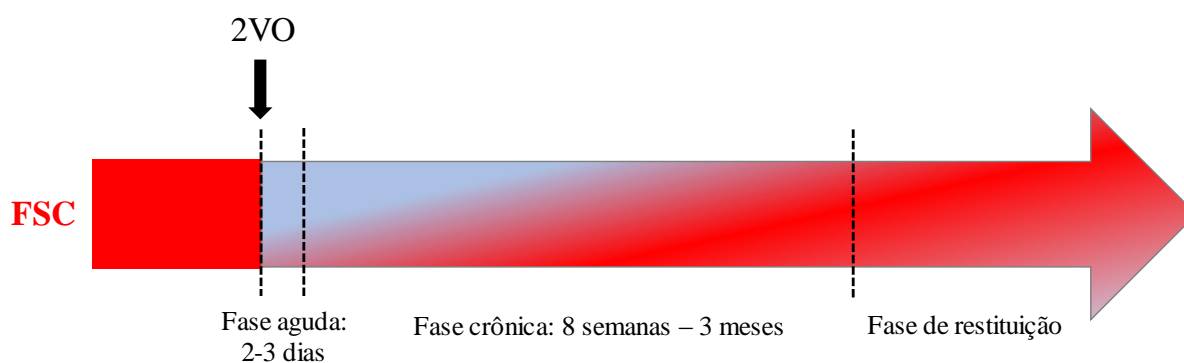


Figura 3: Dinâmica do FSC no modelo 2VO. Fases da hipoperfusão cerebral crônica induzida pela oclusão permanente das carótidas comuns (2VO). FSC: fluxo sanguíneo cerebral (adaptado de Farkas *et al.* 2007) (10).

1.3 O modelo de hipoperfusão cerebral crônica e o dano cognitivo

Testes de avaliação cognitiva foram desenvolvidos nas últimas décadas com objetivo de analisar o aprendizado e a memória espacial ou aversiva, de curto e longo prazo em animais, representando cada área cerebral envolvida no processo. Utilizando o teste do labirinto aquático de Morris (*Morris water maze test*) é possível analisar o aprendizado e a memória espacial de animais para encontrar uma plataforma dentro de uma piscina. No teste é verificado quanto tempo o animal demora a encontrar a plataforma, e quando a plataforma é retirada, é possível verificar quanto tempo ou quantos cruzamentos o animal realizou no local em que se encontrava a plataforma. No trabalho de Hu *et al.*, foi verificado que 8 semanas após a hipoperfusão cerebral, os animais ficaram menos tempo no quadrante da plataforma e demoraram mais tempo para encontrá-la quando comparados com os animais do grupo controle com cirurgia falsa (grupo sham) (11). De acordo com Wang *et al.*, animais 2VO analisados entre a 1^a a 24^a semanas após a 2VO gastaram mais tempo para encontrar a plataforma e realizaram menos cruzamentos na área da mesma, sugerindo um pior desempenho no aprendizado e memória espacial (12). Por fim, Cechetti *et al.* não encontraram diferença significativa na memória após 7 dias de hipoperfusão, somente após 3 e 6 meses da 2VO (13).

Resultados semelhantes foram encontrados utilizando o teste de reconhecimento do novo objeto. Nesse teste, o animal é apresentado a dois objetos semelhantes durante a primeira sessão e, em seguida, um dos dois objetos é substituído por um novo objeto durante

uma segunda sessão. Dependendo do tempo entre a primeira e a segunda sessão, pode-se analisar a memória de curto (intervalo de 1,5 horas) ou longo prazo (24 horas). A quantidade de tempo gasto para explorar o novo objeto fornece um índice de memória de reconhecimento, logo se espera que o animal explore mais o novo objeto do que o objeto familiarizado. Os animais submetidos à 2VO não apresentaram aumento na exploração do novo objeto quando analisados em relação à memória de curto prazo (11). Wang et al. demonstraram que o grupo 2VO apresentou índice de exploração menor em relação a memória a longo prazo após 4, 12 e 24 semanas de hipoperfusão cerebral (12). No entanto, não foram encontradas diferenças nos animais 2VO nas memórias de curto e longo prazo após uma semana de 2VO, mas cronicamente quando analisados 3 e 6 meses, houve redução na exploração do novo objeto quando comparado com o objeto familiarizado (13). Portanto, estes resultados sugerem que a fase crônica da 2VO representa um período importante no comprometimento gradual da capacidade de aprendizagem e da memória.

1.4 Efeitos da hipoperfusão cerebral crônica e as alterações hemodinâmicas periféricas e cerebrais

Em 1836, Cooper foi um dos primeiros a descrever o papel do sistema barorreceptor na regulação da pressão arterial. No entanto, na década de 1920, Hering demonstrou que a estimulação elétrica do nervo do seio carotídeo era capaz de produzir hipotensão e bradicardia, e que a transecção do mesmo abolia essas respostas. Estes reflexos hemodinâmicos são então mediados por estruturas eferentes sensoriais denominadas de barorreceptores. Os barorreceptores são terminações nervosas presentes na camada adventícia de grandes artérias, como as carótidas comuns e respondem à deformação ou estiramento das paredes dos vasos onde estão localizados, principalmente nos seios carotídeos e no arco aórtico, cuja função primária é estabilizar e evitar grandes flutuações da pressão arterial em curto prazo (14).

Os terminais barorreceptores não são estimulados somente pelo aumento da pressão arterial, são mecanorreceptores que respondem às alterações de estiramento da parede arterial. Logo, a acentuada queda no fluxo sanguíneo carotídeo que ocorre após a 2VO, reduz o estiramento das paredes arteriais, e a redução da estimulação dos barorreceptores chega no núcleo do trato solitário na região dorsal do bulbo, reduzindo a atividade vagal, inibindo a

região rostroventrolateral bulbar e aumentando a atividade simpática, que promove o aumento da resistência vascular periférica e aumento da pressão arterial sistêmica (14). Trabalhos prévios demonstraram aumento na ordem de 10 a 12 mmHg da pressão arterial sistólica ou da pressão arterial média, a partir de 24h até 9 semanas após a oclusão bilateral das carótidas comuns (10, 15, 16).

As alterações na pressão arterial sistólica não ficam restritas à região periférica, ocasionando também impactos no SNC. Para isso, o cérebro conta com mecanismos que minimizam ou ajustam a perfusão cerebral de acordo com as alterações de pressão periféricas. Essa defesa é conhecida como mecanismo de autorregulação do fluxo sanguíneo que denota a capacidade intrínseca de um órgão ou leito vascular de manter uma perfusão constante face às alterações da pressão arterial (17).

A autorregulação cerebral dinâmica refere-se à capacidade de compensar mudanças rápidas na pressão de perfusão, ajustando a resistência vascular cerebral. Em indivíduos saudáveis, o FSC não se altera de maneira linear às mudanças na pressão arterial sistêmica, pois a reatividade miogênica das artérias cerebrais e arteríolas protegem a microcirculação contra os efeitos nocivos das mudanças rápidas na pressão arterial, justificando a manutenção da pressão de perfusão capilar constante durante as alterações na pressão arterial (17).

A microcirculação é representada por vasos com diâmetros menores que 120 μm , incluindo as arteríolas, os capilares e as vênulas e tem como principal função fornecer gases e substratos metabólicos às células para atender a demanda tecidual (18, 19).

Na Figura 2, podemos observar a organização dos vasos cerebrais. As artérias da superfície pial se ramificam em artérias penetrantes e então se ramificam em arteríolas que terminam em uma extensa rede de capilares, representando a maior área de superfície para troca de oxigênio no tecido cerebral. Os capilares cerebrais representam os ramos mais finos da árvore vascular e, ao contrário das artérias, formam anastomoses e criam uma rede vascular tridimensional. Por definição, os capilares são vasos que variam de 4 a 12 μm de diâmetro e apresentam paredes compostas exclusivamente de células endoteliais com fenestrações que variam de acordo com o órgão (20).

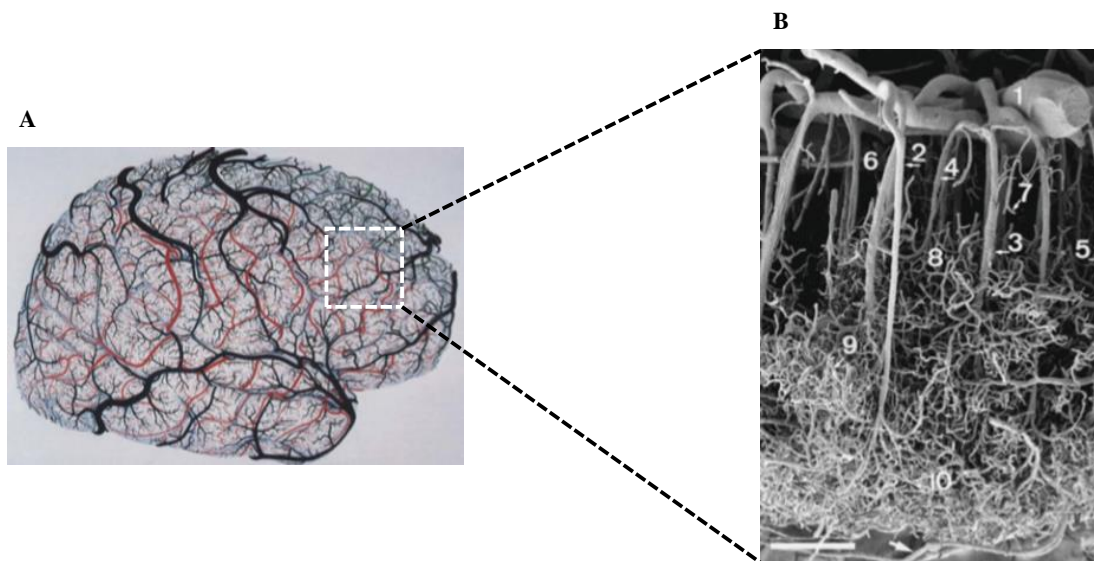


Figura 4: Microcirculação do cérebro humano. Em A, a imagem representa os vasos piais corticais humanos, no qual artérias (vermelho), veias (preto) e a extensa rede de artérias/arteríolas piais sobre a superfície do cérebro podem ser identificadas. Em B, por meio da micrografia eletrônica de varredura é possível observar artérias penetrantes e veias ascendentes intracorticais do córtex cerebral humano. Barra de escala = 375 μm (Figura adaptada de Dalkara et al., 2015) (18).

As alterações no FSC foram demonstradas em diversos trabalhos que avaliaram as variações de fluxo após a 2VO a curto e a longo prazo. No trabalho do nosso grupo, foi observada por fluxometria microvascular com laser speckle uma redução significativa de 20% do fluxo do córtex cerebral na fase aguda e crônica após a 2VO (16). Outros estudos demonstraram igualmente que o modelo de 2VO induz redução do fluxo sanguíneo cerebral em áreas do córtex e hipocampo que foram observadas tanto na fase aguda, até 1 semana após a hipoperfusão cerebral (21); no entanto, na fase crônica após 4 semanas, os valores de fluxo retornam aos níveis basais.

Levando em consideração que a disfunção vascular é uma característica da demência, a manutenção adequada da perfusão tecidual por meio de uma densa rede microvascular é fundamental para garantir a preservação da função cerebral (22-24). Estudos sugerem que com o envelhecimento há um comprometimento funcional da microcirculação cerebral, que desempenha um papel crítico no processo de declínio cognitivo relacionado à idade (25, 26).

Em um estudo com 153 pacientes diagnosticados com demência foi verificado, *post-mortem*, anormalidades nos capilares incluindo tortuosidade, bem como oclusão vascular

foram evidentes, sugerindo que a hipoperfusão cerebral ou as alterações isquêmicas são provavelmente a causa de anormalidades microvasculares (27).

Em conjunto, esses resultados sugerem que as alterações micro e macrovasculares estão relacionadas ao processo de neurodegeneração, e que podem estar presentes antes do estabelecimento da demência (28).

1.5 Neuroinflamação

O sistema cerebrovascular desempenha um papel importante na resposta inflamatória, produzindo ou expressando, por exemplo, fatores inflamatórios e moléculas de adesão. A unidade neurovascular é uma estrutura que faz a comunicação entre o sistema circulatório e o SNC, e é formada por células endoteliais, astrócitos, neurônios e pericitos. Alterações no FSC, pressão arterial e consumo de oxigênio podem gerar perturbações na unidade neurovascular, colocando em risco a barreira hematoencefálica (BHE) e o funcionamento cerebral (29-31).

Os astrócitos exercem papel importante na comunicação com os vasos sanguíneos desempenhando papel central na manutenção da BHE e FSC, imprescindível para a nutrição dos neurônios. As terminações astrocíticas ou pés astrocíticos (*endfeet*) localizados ao redor dos vasos sanguíneos cerebrais formam um dos elementos-chave na estrutura da BHE. Os astrócitos parecem ser capazes de mediar a vasoconstrição e a vasodilatação através de liberação de prostaglandinas, óxido nítrico e ácido araquidônico, muitas vezes em resposta a alterações na atividade sináptica (32, 33).

O envelhecimento é o principal fator de risco para as demências e durante esse processo os astrócitos apresentam redução das suas funções, e conseqüentemente impacto na unidade neurovascular e na BHE (34). A ativação astrocítica na maioria das vezes é verificada através de imuno-marcação de tecido cerebral pelo aumento de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), subunidade dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular que está presente no citoplasma de astrócitos (35, 36). Há um consenso na literatura de que os astrócitos estão mais ativados no envelhecimento tanto em modelos experimentais quanto em humanos, apresentando modificações em sua morfologia, caracterizadas pela atrofia e redução no número de processos refletindo uma diminuição em seus domínios astrocíticos indicando, portanto, uma redução na cobertura astrogliar de neurônios localizados nesse espaço (34, 37,

38). Ainda, a atrofia dos processos astrocíticos reduz o contato direto com os vasos sanguíneos contribuindo para a disfunção vascular já observada nos estágios iniciais da DA (39). Portanto, os astrócitos apresentam papel crucial na unidade neurovascular, na estrutura da BHE e íntima relação com os capilares.

Os astrócitos juntamente com as microglias participam da resposta imune no SNC e a localização destas células na BHE, ou próxima a ela, provavelmente as tornam sentinelas no parênquima cerebral (33). A microglia é a célula imune residente mais comum, representando a primeira resposta inflamatória no tecido cerebral, sendo em geral, ativada durante infecções, lesões ou doenças degenerativas (40). Quando ativada, a microglia sofre mudanças morfológicas, tornando-se capaz de proliferar intensamente e realizar fagocitose (41-43).

A via clássica da ativação da microglia é o fenótipo “M1” ativada por lipopolissacarídeo (LPS), IFN- γ ou TNF- α (44). A ativação microglial para o perfil M1 desempenha um papel essencial na defesa contra patógenos e células tumorais pela produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23 e radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (EROs), apresentando morfologia hiper-ramificada e, posteriormente, amebóide, um processo que tem sido sugerido ajudar a microglia a invadir as lesões (45). Por outro lado, o fenótipo anti-inflamatório M2 promove remodelação/reparo tecidual e angiogênese por meio da liberação de altos níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4, IL-13 e TGF- β , e baixos níveis de citocinas inflamatórias, apresentando morfologia mais próxima do seu estado basal: ramificada com processos longos e finos (46).

Como citado anteriormente, a ativação das células gliais induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas promovendo a infiltração de leucócitos circulantes para dentro do cérebro levando ao processo inflamatório crônico presente na demência (47). Quando há um desequilíbrio na BHE, como ocorre nas doenças neurodegenerativas, leucócitos e outras células imunes da periferia podem alcançar o SNC. A transmigração destas células através da BHE é um processo dinâmico e depende de vários passos sequenciais, porém interdependentes, constituindo marginação, rolamento, adesão e transmigração (48). Durante o processo inflamatório, moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e moléculas de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) aumentam a sua expressão no SNC. Por serem também liberadas na forma solúvel na corrente sanguínea, podem ser biomarcadores da inflamação vascular e disfunção da BHE. A expressão de VCAM-1, ICAM-1, E-selectina e P-selectina

solúveis foram observadas em altos níveis plasmáticos em pacientes com DA, sugerindo a presença de inflamação vascular (49-51).

O processo de envelhecimento, demência e doenças metabólicas, como hipertensão e diabetes compartilham mecanismos celulares e moleculares da neuroinflamação e são considerados como fatores silenciosos do processo de neurodegeneração. Nos idosos, mecanismos inflamatórios têm sido associados à patogênese da demência e comprometimento de funções motoras e cognitivas (22, 23, 26).

Somados à perda da função cognitiva, o desenvolvimento da demência pode englobar alterações micro e macrocirculatórias no tecido cerebral, assim como a neuroinflamação. Logo, o estudo de abordagens terapêuticas que visem prevenir ou minimizar essas alterações será de grande importância para a sociedade.

1.6 Intervenção terapêutica com o exercício físico

O exercício físico regular é um componente importante para um estilo de vida saudável, capaz de diminuir o risco de desenvolvimento e progressão de doenças crônicas, como diabetes mellitus e hipertensão arterial (52, 53).

Estudos experimentais e clínicos vêm demonstrando que a fase aguda após uma isquemia cerebral é a janela crítica para o comprometimento da plasticidade neuronal, sendo um período no qual tratamentos específicos podem desencadear e promover mecanismos neuroprotetores que irão auxiliar na recuperação das funções neuronais (54-57).

Atualmente, o exercício físico já é indicado como tratamento auxiliar no controle de diversas patologias, como a hipertensão arterial, diabetes e depressão em idosos (58, 59). A maior parte da literatura sobre as intervenções com exercício físico na pesquisa da demência tem se concentrado em torno da DA. De fato, uma terapia preventiva frequentemente recomendada contra o comprometimento cognitivo na DA é o exercício físico regular, uma estratégia que tem uma ligação clara com integridade vascular. Em idosos saudáveis, cognitivamente normais, a aptidão cardiovascular tem se mostrado protetora contra o declínio cognitivo (60). O exercício físico regular também demonstrou melhorar a função cognitiva em idosos saudáveis em relação à velocidade de processamento, atenção e função executiva (61). Além disso, estudos randomizados que utilizaram o exercício físico aeróbio durante 12 a 16

semanas e iniciado no estágio inicial - moderado da DA relataram taxas mais lentas de declínio cognitivo (62-64).

Um estudo utilizando o modelo de AVE demonstrou que o exercício aeróbio iniciado 24 horas após o evento isquêmico e mantido por 14 dias foi capaz de promover significativamente a recuperação da coordenação locomotora e memória espacial em ratos. No entanto, as funções sensorio-motoras e vestibulomotoras não foram impactadas (56). Outros grupos encontraram evidências de que o exercício precoce (iniciado entre 24-72 h pós-AVE) diminui as citocinas inflamatórias (65), a permeabilidade da BHE (66), a apoptose neuronal (67), aumenta a neurogênese (67), e melhora a função cognitiva em modelos experimentais de AVE (68). Resumidamente, o momento ideal para começar a reabilitação após um AVE permanece incerto, embora a evidência crescente é que, pelo menos, o início de estratégias de reabilitação dentro das primeiras 2 semanas de AVE é benéfico, ressaltando a importância de um trabalho interdisciplinar (55).

O comprometimento cognitivo está associado a apoptose, a neuroinflamação e a diminuição da plasticidade sináptica. Plasticidade sináptica é a capacidade de alterar a estrutura e a função sináptica para se adaptar às mudanças ambientais, ao armazenamento de informações e em respostas a morte neuronal. É mediada por mudanças na composição molecular e na modificação química das proteínas sinápticas e desempenha um papel vital no desenvolvimento da aprendizagem e memória. Tanto a transmissão sináptica e a plasticidade neuronal são cruciais para todos os aspectos da função do sistema nervoso e críticos para o desenvolvimento adequado do SNC. Mudanças na plasticidade sináptica podem causar alterações na estrutura sináptica, alterando não apenas o número e o tamanho das sinapses, mas também o número de vesículas pré-sinápticas e a densidade pós-sináptica e contribuem para transtornos neurológicos (69-71).

A sinaptofisina, um tipo de glicoproteína de ligação ao cálcio amplamente distribuída na membrana vesicular pré-sináptica, é considerada como uma proteína marcadora específica dos terminais pré-sinápticos (72, 73). A perda de sinapses e a concentração de sinaptofisina tem se mostrado correlacionada com o nível de comprometimento cognitivo na demência (74-77). Estudos anteriores demonstraram que a expressão desses marcadores no córtex pré-frontal e o hipocampo aumentaram após diferentes tipos de exercício físico (78, 79).

A densidade pós-sináptica corresponde à quantidade total de várias proteínas associadas à membrana pós-sináptica neuronal, como por exemplo, os receptores glutamatérgicos

NMDA e AMPA e a proteína PSD-95 (69). A PSD-95 é uma importante proteína de suporte pós-sináptico que desempenha papel crítico no desenvolvimento sináptico e na plasticidade neural. Os níveis sinápticos de PSD-95 encontram-se diminuídos na doença de Alzheimer e o grau de redução correlaciona-se com o nível de beta-amilóide (β A) (marcador da doença de Alzheimer) e com a gravidade da demência (80-82).

O exercício físico também é capaz de induzir a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo responsável pela sobrevivência, maturação e proliferação dos neurônios, e também pela plasticidade, desempenhando um papel importante no aprendizado e na memória (83, 84).

Dadas as evidências na literatura demonstrando que a hipoperfusão cerebral crônica representa um modelo experimental para o estudo da demência, em especial, a demência vascular e que o exercício físico é uma abordagem terapêutica capaz de induzir benefícios no SNC, se faz necessário investigar o impacto deste tratamento na microcirculação cerebral, assim como na interação dos capilares com as células da glia e a relação destes com a função cognitiva.

2. JUSTIFICATIVA

O estudo de fatores importantes para o desenvolvimento e/ou a progressão da demência, como a hipoperfusão cerebral crônica sobre a microcirculação cerebral e a neuroinflamação é de grande valia. Neste contexto, investigar os efeitos do exercício físico é determinante para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas para estes casos, formando assim uma possível área de atuação, para prevenir as alterações cognitivas e a sua evolução para demência.

3. HIPÓTESE DE TRABALHO

A hipoperfusão cerebral crônica induz danos na microcirculação cerebral e neuroinflamação capazes de gerar disfunção cognitiva. Sendo assim, o exercício físico iniciado de forma precoce, durante a fase aguda da isquemia, seria capaz de proteger ou

amenizar danos microvasculares e inflamatórios no cérebro e conseqüentemente os futuros danos cognitivos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos neuroprotetores do treinamento físico precoce em um modelo de hipoperfusão cerebral crônica em ratos.

4.2 Objetivos específicos

- I) Comparar o efeito da hipoperfusão cerebral, aguda e crônica, com ratos idosos sobre a densidade microvascular cerebral, a inflamação vascular e o fluxo sanguíneo cortical cerebral.

- II) Investigar os efeitos de 12 semanas de treinamento físico em animais submetidos à hipoperfusão cerebral crônica sobre variáveis micro e macro hemodinâmicas como: a pressão arterial sistólica, a densidade microvascular cerebral e o fluxo sanguíneo cortical cerebral.

- III) Investigar o efeito de 12 semanas de treinamento físico em animais submetidos à hipoperfusão cerebral crônica sobre a função cognitiva e o conteúdo proteico de sinaptofisina e PSD-95.

- IV) Investigar o efeito de 12 semanas de treinamento físico em animais submetidos à hipoperfusão cerebral crônica sobre variáveis neuroinflamatórias como: a inflamação vascular, a ativação da microglia, a ativação de astrócitos e a interação dessas células da glia com o vaso.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 90 ratos machos Wistar Kyoto jovens com idade de 3 meses e peso aproximado de 300g e 8 ratos machos Wistar Kyoto idosos com idade de 21 meses e peso aproximado de 600 g, todos fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (CECAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), luz (ciclos de 12h claro/escuro) e com comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo número L-002/2016).

5.2 Desenho experimental da padronização do modelo de hipoperfusão cerebral e comparação com animais idosos

Os animais jovens foram divididos em quatro grupos experimentais: (1) CTL jovem: grupo controle composto por animais jovens sem oclusão bilateral das carótidas comuns (n=7); (2) 2VO-24h: animais submetidos à cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns por 24 horas (n=7); (3) 2VO-72h: animais submetidos à cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns por 72 horas (n=7) e (4) 2VO crônico: animais submetidos à cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns por 12 semanas (n=8). O quinto grupo foi composto por animais controle idosos, ou seja, animais idosos e a sem oclusão bilateral das carótidas: CTL idoso (n=8). Todos os animais foram avaliados em relação à densidade capilar funcional e interação leucócito-endotélio cerebrais por microscopia intravital e o FSC por fluxometria com laser speckle e contraste de imagem. A seguir, a Figura 3 representa o desenho experimental utilizado para investigar o efeito **agudo e crônico da hipoperfusão cerebral crônica**.

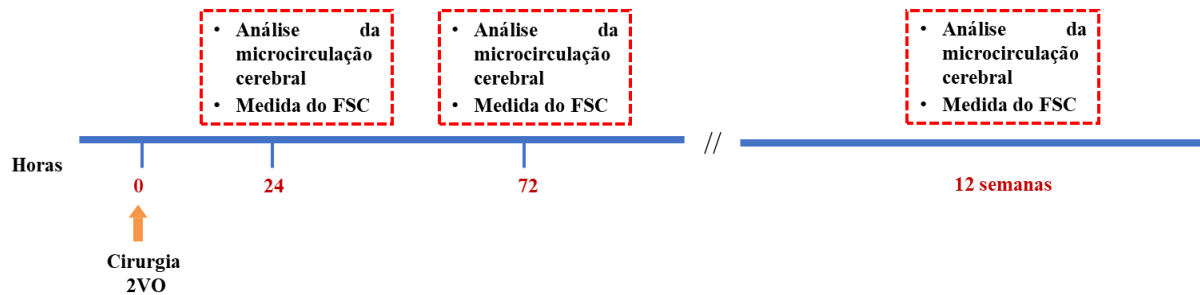


Figura 5: Desenho experimental para investigar os efeitos agudos e crônicos da hipoperfusão cerebral em animais jovens. 2VO: modelo de hipoperfusão cerebral por oclusão bilateral das carótidas comuns; FSC: fluxo sanguíneo cerebral.

5.3 Desenho experimental do tratamento com exercício físico no modelo de hipoperfusão cerebral crônica

Os animais com 12 semanas de idade foram divididos em dois grupos experimentais: (1) grupo Sham: animais com cirurgia falsa, ou seja, submetidos à cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns, mas sem a oclusão; (2) grupo 2VO: animais submetidos à cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns. Três dias após a cirurgia falsa ou 2VO, os animais foram **subdivididos em quatro grupos experimentais** (n= 12-15 por grupo): (1) grupo Sham-Sed: animais submetidos à cirurgia Sham e sedentários; (2) grupo Sham-Ex: animais submetidos à cirurgia Sham e ao exercício físico; (3) grupo 2VO-Sed: animais submetidos à cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns e sedentários e (4) grupo 2VO-Ex: animais submetidos à cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns e ao exercício físico. **Após 12 semanas de exercício físico ou sedentarismo**, os animais foram avaliados em relação a: cognição, pressão arterial sistólica (também foi medida antes e 48 horas após a cirurgia), densidade capilar funcional, interação leucócito-endotélio e fluxo sanguíneo cerebrais, proteínas sinápticas e ativação da microglia e astrócitos no córtex e hipocampo. A Figura 4 apresenta o desenho experimental para investigação dos efeitos do treinamento físico.

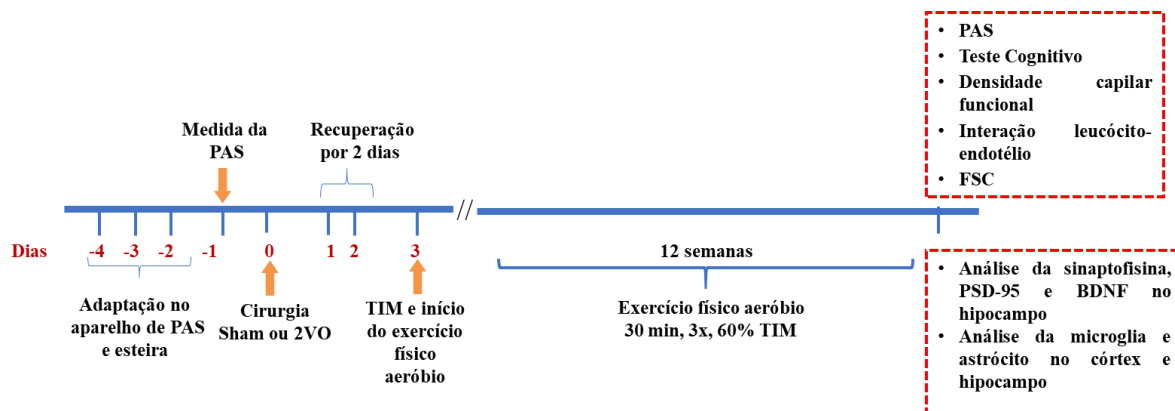


Figura 6: Desenho experimental para investigar os efeitos do exercício físico. 2VO: modelo de hipoperfusão cerebral por oclusão das carótidas comuns; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; FSC: fluxo sanguíneo cerebral; PAS: pressão arterial sistólica; TIM: teste incremental máximo.

5.4 Procedimento cirúrgico para o modelo de hipoperfusão cerebral por oclusão bilateral das carótidas comuns (2VO)

Os animais do grupo 2VO foram anestesiados com associação de ketamina (90 mg/kg, ip) e xylazina (10 mg/kg, ip), e após a verificação da anestesia pela perda do reflexo podal através do pinçamento da pata traseira, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, submetidos à tricotomia no pescoço e, com o auxílio de um bisturi, foi realizada uma pequena incisão para o acesso das artérias carótidas comuns esquerda e direita, como mostra a Figura 5. Em seguida, com auxílio de duas pinças, ambas as artérias foram delicadamente separadas do nervo vago e ocluídas com fio de seda 6-0 não absorvível. A sutura foi feita com fio de sutura Categute absorvível estéril 3.0. Logo após o procedimento, todos os animais submetidos à cirurgia 2VO ou Sham receberam na região do dorso, administrações subcutâneas do antibiótico meropenem (10mg/kg – dose única) e do anti-inflamatório cetoprofeno (1mg/kg/dia por três dias) (16, 85). Após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais por uma semana (grupo 2VO crônico) a fim de proporcionar uma melhor recuperação e amenizar qualquer tipo de estresse com outro animal. Ao final desse período os animais foram novamente reagrupados com 4 animais por gaiola.

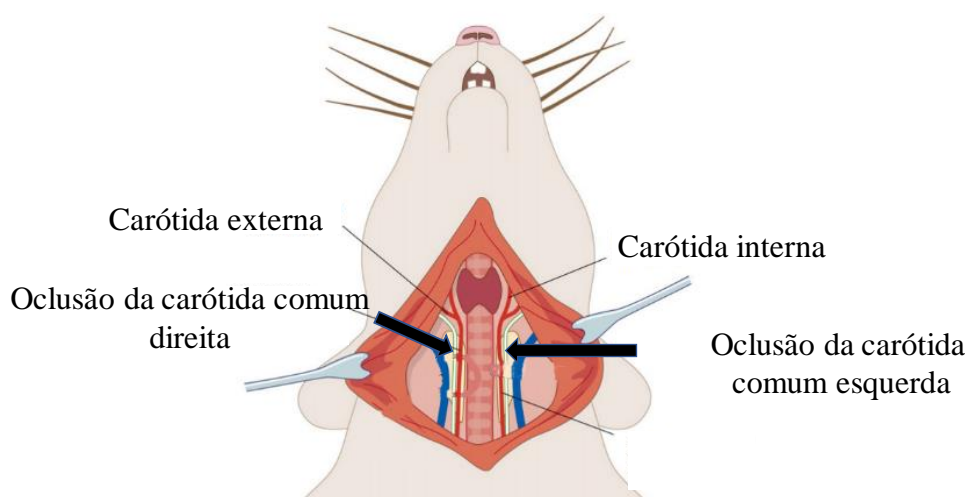


Figura 7: Imagem representativa do procedimento cirúrgico de oclusão bilateral das carótidas comuns em ratos. Imagem adaptada de Wayman et al., 2016 (86).

5.5 Medidas hemodinâmicas

A medida da pressão arterial sistólica foi realizada por meio do método de aferição indireta de plestimografia caudal, não oferecendo riscos para os animais (BP-2000, Visitech, USA - Figura 6). É um procedimento com duração média de 20 minutos, e não invasivo realizado com os animais conscientes em um ambiente escuro e silencioso. Os animais foram colocados dentro de baias de contenção fornecidas pelo próprio fabricante do equipamento.

O aparelho foi ajustado para aferir 15 medidas por animal, que são registradas em um computador acoplado ao aparelho, gerando médias da pressão arterial sistólica (PAS). Os animais foram adaptados ao aparelho por três dias consecutivos antes da medida basal. Essa análise foi feita antes da cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns -2VO ou cirurgia Sham (medida basal), 48 horas após a 2VO e ao final do protocolo (12 semanas).



Figura 8: Aparelho utilizado para a medida da pressão arterial sistólica por pletismografia caudal.

5.6 Teste incremental máximo e protocolo de treinamento físico

Todos os animais foram adaptados durante três dias consecutivos na esteira ergométrica para ratos em uma velocidade de 10 m/min durante 10 minutos (Modelo HT 2.0, Hectron Fitness Equipment, Rio de Janeiro, RJ - Figura 7). Os animais do grupo Exercício foram submetidos ao teste incremental máximo (TIM) para estabelecer a intensidade de exercício relativa de 60% do consumo máximo de oxigênio (VO_{2max}) (87, 88). Mostrou-se anteriormente que existe uma estreita relação entre o TIM e o teste de VO_2 máximo, “padrão ouro”, e esta relação pode ser usada para determinar a capacidade de exercício do animal e prescrever um regime de exercício cuja intensidade seja equivalente a 60% do consumo máximo de oxigênio (89).

O teste foi iniciado com velocidade de 10 m/min e foram feitos aumentos de 3 m/min a cada três minutos. O TIM era encerrado quando o animal chegava à exaustão e mantinha-se por mais de 5 segundos na grade de choque. O TIM foi repetido após 6 semanas de exercício para reajustar a carga de treinamento. O protocolo consistiu em um treinamento 3 vezes por semana, 30 minutos cada sessão e intensidade de 60% da velocidade máxima atingida no TIM. Após 12 semanas de treinamento físico ou sedentarismo, os animais foram avaliados em relação aos parâmetros hemodinâmicos, cognitivo, microcirculatórios, inflamatórios, FSC e análises histológicas e moleculares.



Figura 9: Esteira de treinamento adaptada para ratos utilizada no trabalho.

5.7 Teste de Campo Aberto (*open field test*)

O teste cognitivo de campo aberto consiste em avaliar de forma quantitativa e individual a atividade exploratória e locomotora, bem como a memória de habituação, dos animais. Após 12 semanas da cirurgia 2VO ou Sham, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto (*open field test*, Figura 8) em uma arena, de tamanho $60 \times 40 \times 50$ cm (comprimento x largura x altura), feita de madeira compensada cor bege com uma parede de vidro. O assoalho da arena de campo aberto foi dividido por linhas brancas em 6 ou 9 quadrados iguais.

Para o teste, os animais foram colocados no quadrante posterior esquerdo da arena e o número de vezes que o animal cruzou as linhas brancas (número de cruzamentos, em inglês *crossings*) e se ergueu sobre as patas traseiras (número de erguidas, do inglês *rearings*) dentro da caixa foi registrado durante 5 minutos (sessão treino). Para testar a memória de habituação ao campo aberto, 24 horas depois da sessão de treino, os animais foram recolocados na arena de campo aberto para a livre exploração por 5 minutos, e os mesmos parâmetros foram medidos para avaliar a habituação do animal à arena (90).

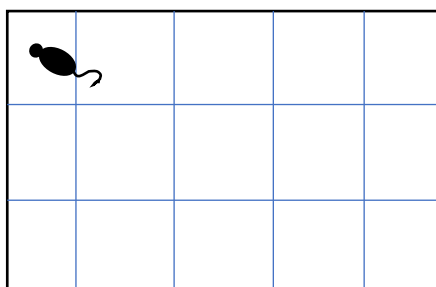


Figura 10: Desenho representativo da caixa do teste de campo aberto.

5.8 Microscopia Intravital Cerebral por Epi-Iluminação e Fluorescência

Todos os grupos experimentais foram submetidos à microscopia intravital. Para a visualização da microcirculação cerebral os animais foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg) e xylazina (10 mg/kg), via intraperitoneal e colocados em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico. Com o auxílio de uma broca de alta frequência (15.000 rpm; Beltec), foi feita uma janela craniana ($0,5\text{ cm}^2$ e 0,1 mm de profundidade) no osso parietal esquerdo do animal e retirada das meninges dura mater e aracnoide para visualização da microcirculação do córtex cerebral e observação desta no microscópio por epi-iluminação (91). Não são necessários procedimentos de hemostasia, mas caso ocorresse sangramento, utilizar-se-ia uma esponja hemostática (Hemospon) própria para este procedimento. A Figura 9 ilustra o este procedimento.

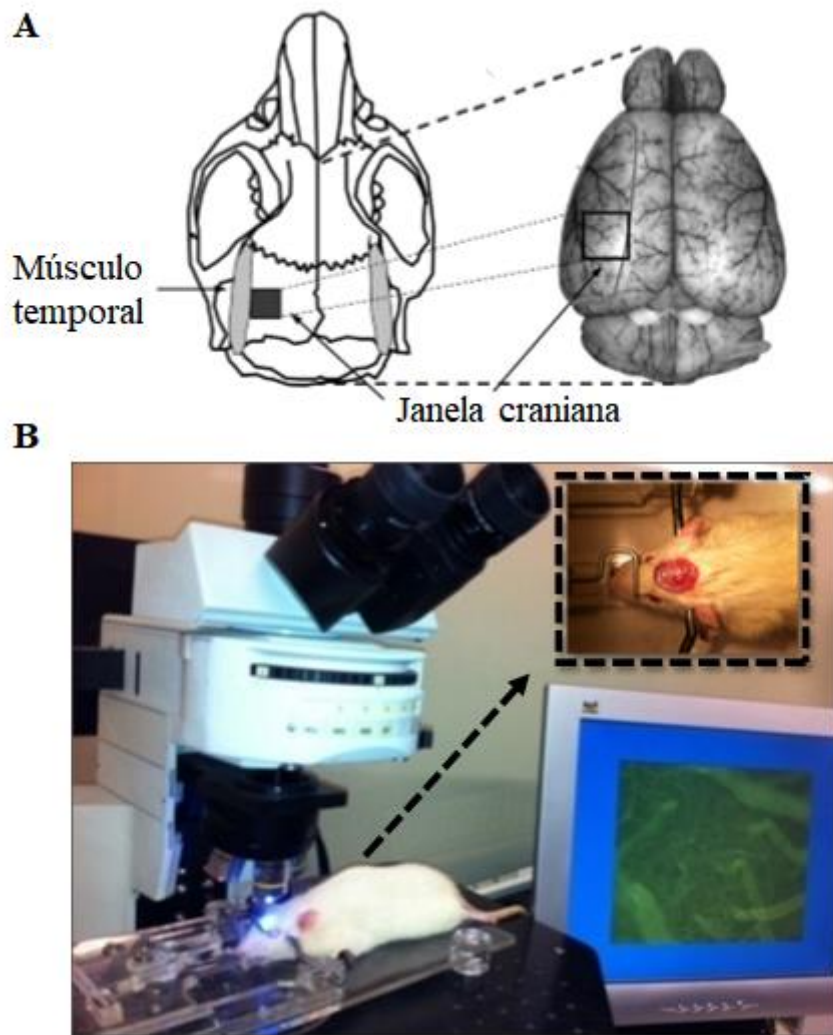


Figura 11: Microscopia intravital do córtex cerebral. Em A, observa-se a posição da janela craniana. A análise foi feita no córtex parietal esquerdo do animal (adaptado de Kataoka et al, 2004) (92). Em B, imagem ilustrativa do experimento em rato, janela craniana vista pelo monitor e microscópio com epi-iluminação e fluorescência.

5.8.1 Análise da densidade capilar funcional (DCF)

Para que os vasos sanguíneos do córtex cerebral fossem visualizados, foi administrado fluoresceína acoplada ao dextran de alto peso molecular (FITC-dextran 150KDa) via intravenosa (veia peniana). As imagens da microcirculação foram adquiridas através do *software* Cell Sens Standart 1.9 (Olympus, NY, U.S.A.). A contagem de capilares foi feita com o auxílio do mesmo *software*, sendo feitas imagens seriadas com oculares de 10x e objetivas de 10x (Olympus BX150WI, NY, U.S.A.), em quatro campos. Para cada campo, era

destinado um minuto para a contagem dos capilares, obtendo ao final o número de capilares por mm^2 . Foram quantificados os capilares que estavam continuamente perfundidos por hemácias e expressos em densidade capilar funcional média (93, 94). A representação da contagem da DCF pode ser vista na Figura 10.

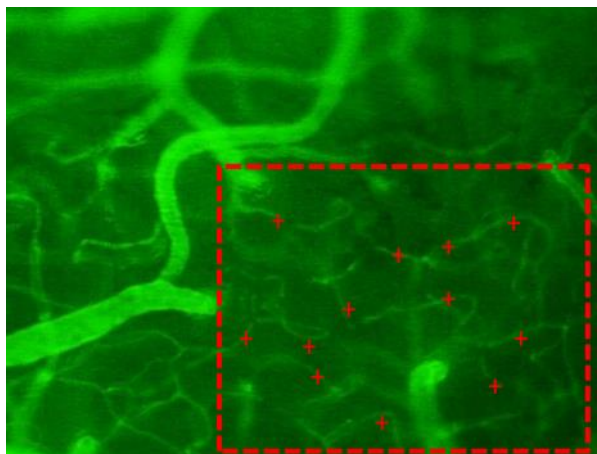


Figura 12: Fotomicrografia representativa da microcirculação cerebral de rato Wistar Kyoto. Campo pontilhado representa a área de análise da densidade capilar funcional (1mm^2) e cruzes vermelhas marcam os capilares perfundidos.

5.8.2 Avaliação da interação leucócito-endotélio

Para marcação dos leucócitos circulantes foi feita a administração intravenosa (veia peniana) de 0,3 mg/kg de rodamina 6G e os leucócitos com a fluorescência associada foram visualizados através da microscopia descrita acima. A interação leucócito-endotélio foi avaliada determinando o número de leucócitos aderidos à parede vênular por um período de 30 segundos e o rolamento de leucócitos quando estes se moveram dentro do vaso em velocidade inferior aos eritrócitos circulantes e expressos em células/min. Foram analisados vasos da superfície cerebral com diâmetros variando de 50 a 100 μm e a adesão leucocitária sendo expressa em número de células/min/100 μm . O tempo do procedimento cirúrgico total durou, em média, 40 minutos (93, 94). A Figura 11 representa a interação leucócito-endotélio à parede vênular.

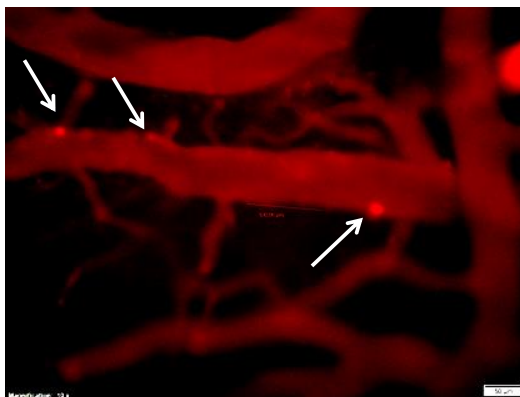


Figura 13: Imagem representativa da microscopia intravital e da interação leucócito-endotélio vênular. Setas apontam leucócitos marcados com rodamina 6G, aderidos e/ou rolando em vênulas pós-capilares de ratos. Barra: 50 μ m; aumento de 200X.

5.9 Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral por fluxometria microvascular à laser

A partir da janela craniana descrita acima, a avaliação do FSC foi feita por meio da metodologia de laser speckle com contraste de imagem – LSCI (Perimed, Estocolmo, Suécia). Essa técnica permite a análise do fluxo sanguíneo em superfícies extensas sem a necessidade de administrar marcadores sistêmicos. Com o comprimento de onda de 785 nm, o LSCI mede a velocidade média e quantidade de hemácias dentro dos vasos. Sendo assim, consegue medir em tempo real o comportamento e a perfusão do tecido desejado (95, 96).

Com o animal ainda anestesiado e no aparelho estereotáxico, o mesmo foi colocado sob o feixe de raios laser a uma distância de 10 cm (recomendada pelo fabricante) entre a superfície cerebral e o emissor de luz laser. A partir disso, duas áreas cerebrais foram selecionadas: (1) janela craniana com a exposição da superfície cerebral e (2) o lado oposto à janela, com o osso parietal direito intacto. As imagens foram analisadas utilizando o software do mesmo fabricante (PIMSoft, Perimed, Estocolmo, Suécia) sendo ajustadas para gravar 16 imagens por segundo e expressas em unidades arbitrárias de perfusão. Na Figura 12 podemos observar as etapas citadas anteriormente para a medida do FSC.

O animal foi morto por overdose de pentobarbital (150 mg/kg de, i.p.). O cérebro foi dissecado e as regiões do hipocampo e do córtex foram selecionadas. O hipocampo e córtex do hemisfério esquerdo foram armazenados no freezer a -80°C para análise de *Western blot*.

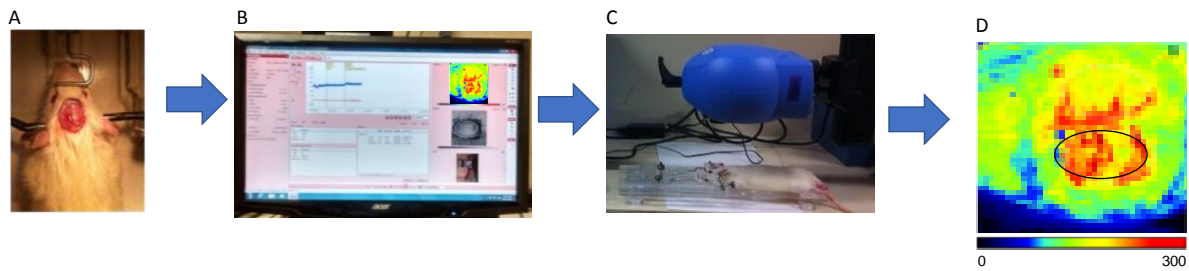


Figura 14: Imagem ilustrativa da avaliação do fluxo sanguíneo cerebral através do laser Speckle. A Figura A representa a janela craniana, B medida do fluxo sanguíneo cerebral gerada pelo software, C animal sob o laser e D imagem do fluxo sanguíneo cerebral em uma escala de 0 a 300 unidades arbitrárias.

5.10 Avaliação do conteúdo proteico por Western blot

A quantificação das proteínas PSD-95, sinaptofisina e BDNF foram feitas pela técnica de *Western blot*. As amostras de hipocampo foram preparadas utilizando tampão RIPA (Tris 50mM, NaCl 150mM, SDS 0.1 %, deoxycolato de sódio 0.5 %, NP40 1% e coquetel de inibidores de protease). O homogenato em tampão RIPA foi incubado por 30 minutos no gelo, sonificado por 5 minutos e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. Com o sobrenadante foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de reação ao ácido bicinchonínico (BCA). O método BCA foi preparado adicionando-se cinquenta partes do reagente A (ácido bicinônico) a uma parte do reagente B (sulfato de cobre II). Foi realizada uma curva padrão através de diluições seriadas de albumina humana fornecida pelo próprio fabricante do kit. Após a dosagem de proteínas, as amostras foram diluídas em tampão de amostra (50 μ M Tris; 10% SDS; Glicerol; β -mercaptoetanol; azul de bromofenol) para que fosse adicionado 7,5 μ g de proteínas totais por poço do gel. As amostras foram colocadas no gel de poliacrilamida (12%) e uma corrente de 120V por aproximadamente 2 horas. Em seguida, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (previamente ativadas em metanol 100%) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada, utilizando tampão de transferência (Tris-Glicina 1X e metanol 20%) e corrente de 400mA por aproximadamente 2 horas. Após a transferência, as membranas foram embebidas em tampão de bloqueio (5% albumina bovina e TBS-Tween) por uma hora com solução bloqueadora preparada com BSA 5% diluída em TBS-Tween (10 mM de Tris; 150 mM NaCl; 0,05% Tween; pH = 7,4). Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo primário (anti PSD-95; anti-

sinaptofisina e anti-BDNF todos da abcam) diluído em solução de bloqueio e TBS-Tween na proporção 1:5000, 1:500 e 1:1000 respectivamente durante a noite (*overnight*). Após o período de incubação com anticorpo primário, a membrana foi embebida em solução contendo os anticorpos secundários (anti-coelho, ou anti-camundongo – Li-Cor Biosciences, diluição 1:20.000), diluídos em TBS-Tween, durante trinta minutos, em seguida as membranas foram escaneadas no Odyssey system™ e a densitometria foi feita com auxílio do software ImageJ. β -actina foi utilizada como padrão (diluição 1:10.000 Abcam).

5.11 Análise imuno-histoquímica

Para a análise de imuno-histoquímica, 4 animais por grupo foram anestesiados com ketamina (90 mg/kg) e xylazina (10 mg/kg), via intraperitoneal e submetidos a perfusão cardíaca com solução salina (NaCl 0,9%) e, posteriormente, com solução tamponada de paraformaldeído 4% para fixação do tecido (97, 98). Em seguida, o cérebro foi retirado e armazenado em solução de PFA 4% em geladeira por 5 dias. Após, as amostras foram conservadas em PBS 1x em geladeira por 2 dias para serem cortados (corte coronal) em um vibrátomo (Olympus) em seções de 50 μ m para análise por imuno-histoquímica (4 lâminas por animal e 2 campos por lâmina).

Os cortes foram acondicionados em placas de cultura de 24 poços (Corning) e lavados 3 vezes, por 5 minutos com PBS 0,1M pH 7,4 (os cortes em vibrátomo são acomodados nos poços da placa de 24 poços, de modo que o material fique imerso nas soluções, inclusive na solução contendo anticorpo, para garantir que o mesmo penetre de forma homogênea. Este tipo de Imunofluorescência é conhecido como imunofluorescência flutuante - *free floating immunofluorescence*).

Em seguida, foram incubados com uma solução de bloqueio (soro normal de cabra a 10%, em solução salina tamponada com fosfato contendo 0,15% de Triton X-100) durante 2h à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos policlonal anti-GFAP (Dako – Z033401 1:400), anti-Iba1 (Wako – 1:200) e isolectina B4 (IB4 Vector Labs – B-1205 1:100) diluídos em PBS 0,3% triton 10% NGS. A incubação com os anticorpos primários e com IB4 foi feita em câmara úmida por 12 h a 4°C.

Após este período, os cortes foram lavados três vezes com PBS, cada lavagem com duração de 5 minutos para retirar os resíduos do anticorpo primário e do IB4, em seguida, foram incubados por 2 h à temperatura ambiente sob agitação constante em agitador orbital (Fanem 255b) com: anticorpo secundário de coelho marcado com Cy3 (Sigma) produzido em cabra, na diluição 1:800; anticorpo de camundongo produzido em cabra Alexa 488 (Molecular Probes) na diluição 1:400, e anticorpo monoclonal de camundongo produzido em cabra marcado com Cy3 (Sigma) na diluição 1:800. Para a marcação com IB4, foi utilizado streptavidina conjugada com Cy3 (Sigma) na proporção 1:400, diluídos em PBS triton 0,3%, NGS 10%. Ao término de 2 horas, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS, cada lavagem com duração de 5 minutos e incubados com 20 mg/ml de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, dilactate, Sigma) diluído em água destilada por 3 minutos. Os cortes foram lavados mais uma vez com PBS, montados em lâminas com VECTASHIELD (HardSet Mounting Medium VECTOR Laboratories) e mantidos à -20°C. As lâminas foram fotografadas em Microscópio confocal de varredura a laser LSM 510 META (Zeiss) acoplado a um computador equipado com o software ZENBlack.

O estudo dos astrócitos e microglias foi realizado na área CA1 do hipocampo e no córtex cerebral. Para quantificar o recobrimento de vasos pelos astrócitos, utilizamos o programa ImageJ e as ferramentas de « Sincronismo de janelas » onde são desenhados ROIs (regiões de interesse) sobre a imagem marcada com GFAP⁺ em sincronia com a imagem de marcação de vasos com IB4 e o resultado foi expresso como porcentagem de fluorescência sobre a área de vaso.

Para a análise da morfologia das microglias, utilizamos a ferramenta de «Sholl analysis » do Programa ImageJ. A análise de Sholl é um método de análise quantitativa criada para estudos em neurônios para analisar as características morfológicas da imagem de um neurônio. Mas pode ser utilizado igualmente para avaliar a morfologia e o perfil de processos de astrócitos e micróglias.

Usando a análise de Sholl, um algoritmo matemático do programa chamado de índice de ramificação é possível comparar a diferença no número de interseções feitas em círculos consecutivos da análise de Sholl em relação à distância do soma da célula da microglia. Neste estudo as análises foram feitas em microglias e os processos microgliais foram quantificados como número de interseções de 2 até 40 µm a partir do soma e número total de interseções com os círculos da análise, representando a ramificação total das microglias (99, 100).

5.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) para cada grupo. Os resultados foram comparados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA One-Way), utilizando o teste de Bonferroni como pós-teste e teste-t de Student não pareado, quando necessário. Os resultados do teste de campo aberto foram comparados através de teste-t de Student pareado. Diferenças com valores de p menores que 0,05 foram consideradas significativas. Todos os cálculos foram realizados por análises informatizadas através de programa estatístico comercialmente disponível (Graphpad Instat e Graphpad Prism, Graphpad Software, California, USA).

6. RESULTADOS

6.1 A hipoperfusão cerebral aguda e crônica induziu rarefação capilar e aumento de rolamento de leucócitos no cérebro

Durante a primeira etapa investigamos o impacto da hipoperfusão cerebral em ratos jovens submetidos à hipoperfusão cerebral por 24 ou 72 horas (efeito agudo) ou por 12 semanas (efeito crônico). Com o objetivo de comparar se o efeito crônico da hipoperfusão cerebral induz alterações microcirculatórias e inflamatórias semelhantes durante o envelhecimento, comparamos o grupo submetido à hipoperfusão cerebral por 12 semanas com ratos idosos.

Através da microscopia intravital por epi-iluminação e fluorescência foi possível visualizar a microcirculação do córtex cerebral para a contagem dos capilares continuamente perfundidos (densidade capilar funcional) e a interação leucócito-endotélio em vênulas cerebrais. A hipoperfusão cerebral aguda foi capaz de induzir rarefação capilar no córtex cerebral (2VO-24h: $244 \pm 14,86$ e 2VO-72h: $257 \pm 8,23$ vs. CTL jovem: $348 \pm 16,59$ capilares por mm^2 , $p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente – Figura 13 gráfico A) acompanhada pelo aumento no rolamento de leucócitos quando comparada com o grupo controle jovem (2VO-24h: $11,6 \pm 1,29$ e 2VO-72h: $6,9 \pm 1,08$ vs. CTL jovem: $0,25 \pm 0,12$ células/min, $p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente – Figura 13 gráfico C). O grupo 2VO-72h apresentou redução da DCF significativa quando comparada com o grupo CTL Jovem ($p < 0,05$).

A redução da densidade capilar funcional a curto prazo foi mantida após 12 semanas de hipoperfusão cerebral quando comparado com o grupo controle (2VO crônico: $288,6 \pm 15,33$ capilares por mm^2 , $p < 0,05$ – Figura 13, gráfico A). O grupo 2VO crônico apresentou redução significativa no rolamento de leucócitos quando comparado com o grupo 2VO-24h (2VO crônico: $5,2 \pm 0,88$ células/min, $p < 0,01$ – Figura 13, gráfico C). O modelo de hipoperfusão cerebral crônica não apresentou diferença significativa em relação à densidade capilar funcional quando comparada com o grupo controle de ratos idosos (CTL idoso: $307 \pm 15,35$ capilares/ mm^2 , $p > 0,05$ – Figura 13, gráfico A) e ao rolamento de leucócitos à parede vênular (CTL idoso: $5,1 \pm 1,0$ células/min, $p > 0,05$ – gráfico C). No entanto, o rolamento dos leucócitos foi significativamente menor quando comparados com o grupo 2VO-24h ($p < 0,01$) e maiores quando comparados com o grupo controle ($p < 0,01$). Não foi encontrada diferença estatística em relação ao número de leucócitos aderidos (Figura 13, gráfico B).

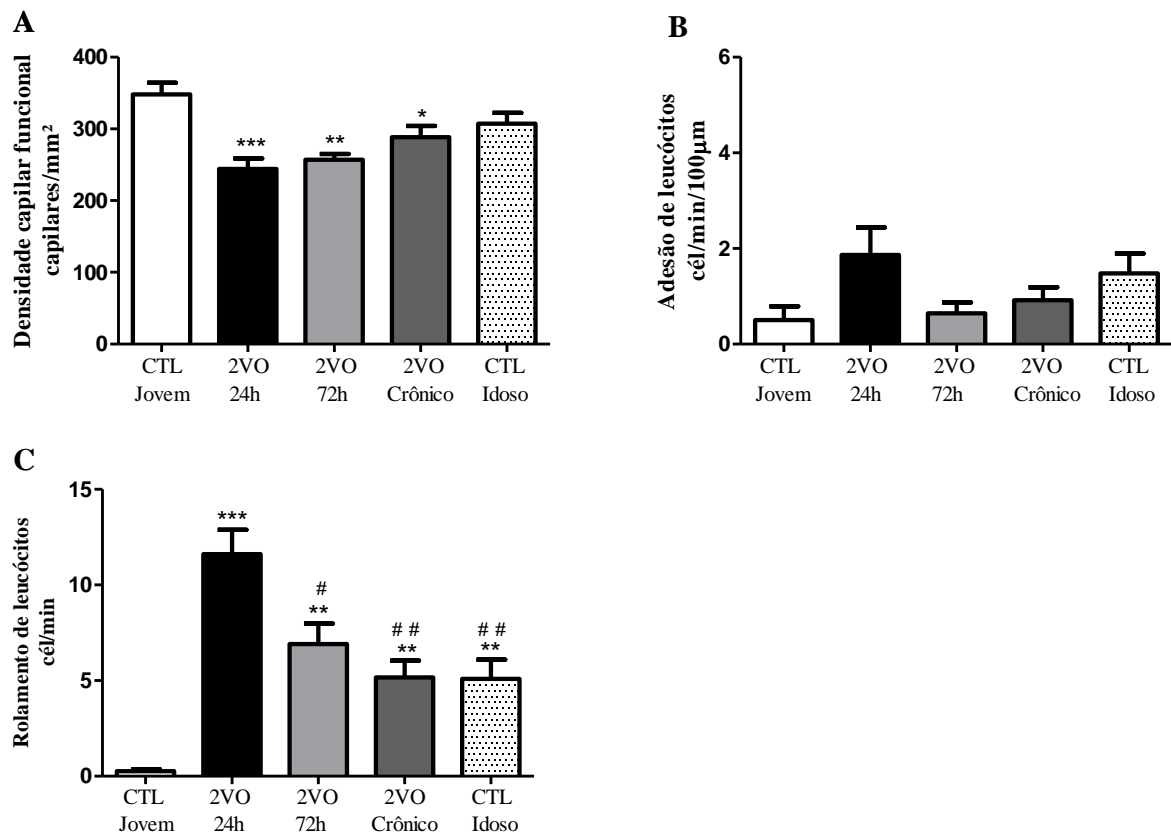


Figura 15: Densidade capilar funcional e interação leucócito-endotélio no córtex cerebral por microscopia intravital por epi-iluminação e fluorescência. Gráfico A: número de capilares continuamente perfundidos. Gráfico B: adesão de leucócitos à parede vênular e gráfico C: rolamento de leucócitos à parede vênular. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 7-8 animais por grupo. CTL jovem: animais controle jovens; 2VO-24h: animais submetidos à hipoperfusão cerebral por 24 horas; 2VO-72h: animais submetidos à hipoperfusão cerebral por 72 horas; 2VO crônico: animais submetidos à hipoperfusão cerebral por 12 semanas e grupo CTL idoso: animais com 21 meses de idade. Em A: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. CTL jovem (ANOVA); Em C: ** $p < 0,01$ 2VO 24h vs. CTL jovem, *** $p < 0,001$ vs. CTL jovem, # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ vs. 2VO 24h (ANOVA); ** $p < 0,01$ dos grupos 2VO crônico e CTL idoso vs. CTL Jovem (teste-t de Student não pareado).

6.2 A redução do fluxo sanguíneo cortical em animais idosos é semelhante à hipoperfusão cerebral aguda e crônica

Utilizando a mesma janela craniana da microscopia intravital, o fluxo sanguíneo do córtex cerebral foi medido por meio da técnica de LSCI. Na Figura 14, observamos que todos os grupos apresentaram redução significativa quando comparados com o grupo CTL jovem (2VO-24h: $167,6 \pm 7,20$; 2VO-72h: $172,9 \pm 7,62$; 2VO crônico: $163,3 \pm 6,89$; CTL idoso: $171,7 \pm 7,43$ vs. CTL: $233,7 \pm 17,89$ unidades arbitrárias de perfusão; $p < 0,01$). Não encontramos diferença estatística entre os grupos 2VO quando comparados com o grupo CTL Idoso ($p > 0,05$).

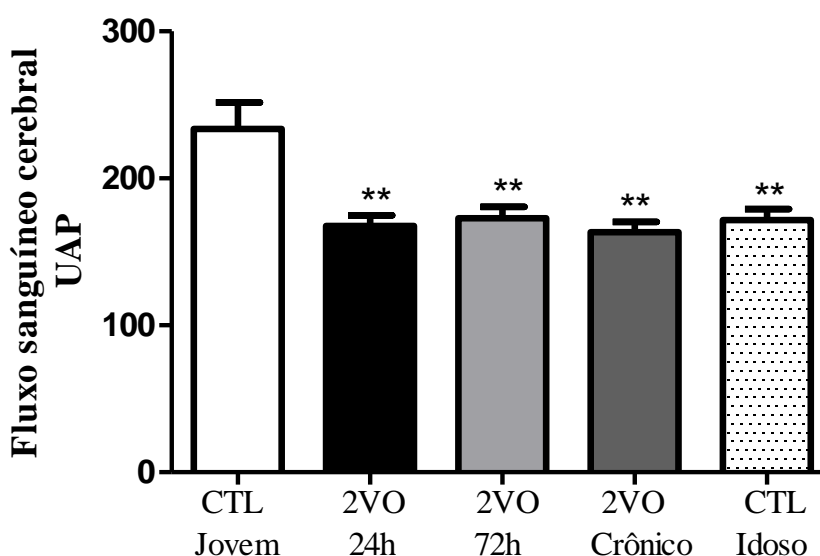


Figura 16: Fluxo sanguíneo do córtex cerebral por laser speckle com contraste de imagem. Os valores representam a média \pm E.P.M. de 7-8 animais por grupo. CTL jovem: animais controle jovens com 3 meses de idade; 2VO-24h: animais submetidos à hipoperfusão cerebral por 24 horas; 2VO-72h: animais submetidos à hipoperfusão cerebral por 72 horas; 2VO crônico: animais submetidos à hipoperfusão cerebral por 12 semanas e grupo CTL idoso: animais com 21 meses de idade. ** $p < 0,01$ vs. CTL jovem (ANOVA).

6.3 Exercício físico por 12 semanas reduziu a pressão arterial sistólica em animais com hipoperfusão cerebral crônica e sedentários

Com base nos resultados apresentados, verificamos que os animais com hipoperfusão cerebral crônica apresentaram alterações microcirculatórias semelhantes aos animais idosos, e sendo assim, utilizamos o modelo de hipoperfusão cerebral crônica para investigarmos os efeitos do treinamento exercício físico sobre as mesmas variáveis acima assim como outras que serão apresentadas a seguir.

A primeira variável estudada foi a pressão arterial sistólica (PAS). A fim de acompanharmos as possíveis modificações da PAS ao longo do experimento, selecionamos três momentos: **antes da cirurgia (Sham ou 2VO), 48h após a cirurgia (Sham ou 2VO) e ao final das 12 semanas de exercício físico ou sedentarismo** (Figura 15). A medida basal da PAS não foi diferente entre os grupos antes da cirurgia (Sham: $123,7 \pm 1,83$ vs. 2VO: $122 \pm 1,93$ mmHg, $p > 0,05$), no entanto, encontramos aumento significativo da PAS 48 horas após a cirurgia no grupo 2VO quando comparado com o grupo Sham (2VO: $147 \pm 4,30$ vs. Sham: $130 \pm 2,39$ mmHg, $p < 0,01$ – Figura 15 gráfico A). Esse aumento foi mantido por 12 semanas no grupo 2VO-Sed quando comparado com o grupo Sham Sed (2VO-Sed: $140,7 \pm 1,75$ vs. Sham Sed: $131 \pm 2,3$ mmHg, $p < 0,05$). O exercício físico por 12 semanas foi capaz de reduzir significativamente a PAS no grupo 2VO-Ex quando comparado com o seu controle sedentário (2VO-Ex: $130 \pm 2,06$ mmHg, $p < 0,01$).

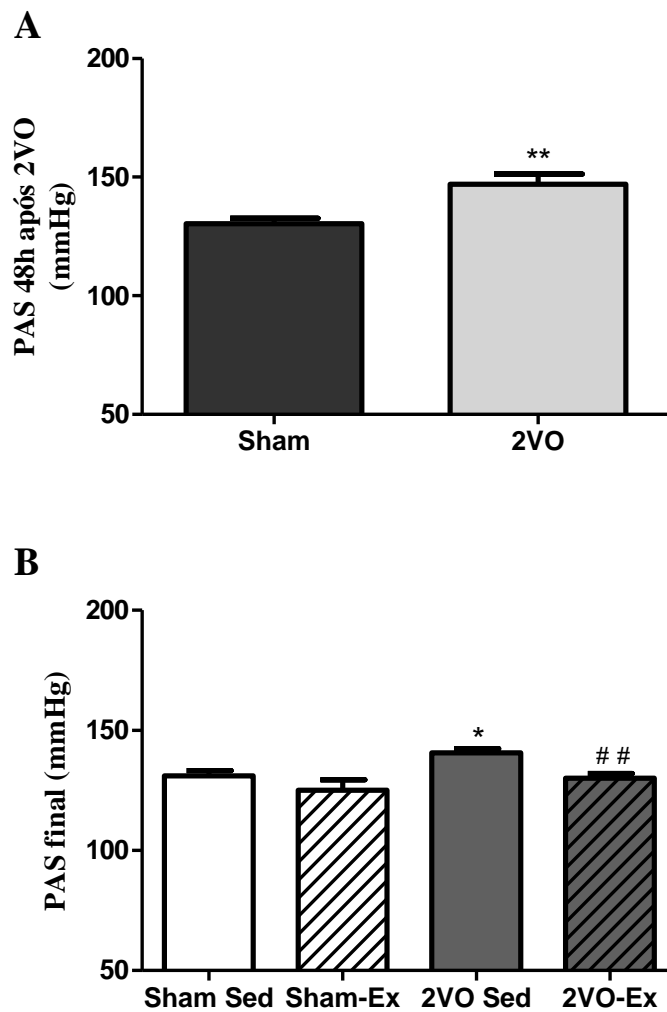


Figura 17: Análise da pressão arterial por pletismografia caudal. Os valores representam a média \pm E.P.M. O gráfico A representa a pressão arterial 48 horas após a cirurgia Sham ou 2VO (n=18-24 por grupo) nos grupos: Sham: animais submetidos à cirurgia Sham e 2VO: animais submetidos a cirurgia de oclusão bilateral das carótidas comuns. O gráfico B representa o efeito do exercício físico ou sedentarismo por 12 semanas (n= 9-12 por grupo) nos grupos: Sham-Sed: animais submetidos à cirurgia Sham e sedentários; Sham-Ex: animais submetidos à cirurgia Sham e ao protocolo de exercício físico; 2VO-Sed: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e sedentários e 2VO-Ex: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e ao protocolo de exercício físico. Em A: **p<0,01 vs. Sham (teste-t de Student não pareado); Em B: *p<0,05 vs. Sham Sed e ## p<0,01 vs.2VO-Sed (ANOVA).

6.4 O desempenho físico não foi alterado em ratos submetidos à hipoperfusão cerebral crônica

Antes de iniciar o protocolo de treinamento físico, os animais foram adaptados à esteira para que posteriormente pudessem realizar o teste incremental máximo. O teste foi realizado antes do início do treinamento (pré) e após 6 semanas de treinamento (reajuste) para reajustar a intensidade do exercício físico para cada animal. Na tabela a seguir, observa-se que ambos os grupos apresentaram aumentos significativos no reajuste quando comparados com os valores pré-treino, em relação ao tempo de exaustão ($p < 0,01$ e $p < 0,05$), velocidade máxima atingida ($p < 0,05$), distância máxima percorrida ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) e velocidade de treino ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos no pré-treinamento.

Parâmetro	Sham-Ex	2VO-Ex
Tempo de exaustão (min)		
Pré	14,52 ± 1,74	14,63 ± 2,14
Reajuste	20,89 ± 1,21 &&	19,57 ± 1,89 §
Velocidade máxima atingida (m/min)		
Pré	25 ± 0,91	25,75 ± 0,84
Reajuste	29,1 ± 1,23 &	30 ± 0,77 §
Distância máxima atingida (m)		
Pré	283 ± 23,38	322 ± 23,64
Reajuste	405 ± 31,64 &	429,7 ± 23,03 §§
Velocidade de treino (m/min)		
Pré	15 ± 0,54	15,45 ± 0,50
Reajuste	17,45 ± 0,74 &	18 ± 0,46 §§

Tabela 1: Parâmetros do teste incremental máximo. Valores antes do início do treinamento e após 6 semanas de exercício físico. Os valores representam a média ± E.P.M dos grupos (n=12-15 por grupo). Sham-Ex: animais submetidos à cirurgia Sham e ao protocolo de exercício físico e 2VO-Ex: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e ao protocolo de exercício físico. & $p < 0,05$ vs. Sham-Ex pré; && $p < 0,01$ vs. Sham-Ex pré; § $p < 0,05$ vs. 2VO-Ex pré e §§ $p < 0,01$ vs. 2VO-Ex pré (teste-t de Student).

6.5 O exercício físico moderado durante 12 semanas foi capaz de melhorar a memória de habituação no teste de campo aberto

Após 12 semanas de exercício físico ou sedentarismo os animais foram avaliados em relação à função cognitiva pelo teste de campo aberto. Nesse teste, espera-se que os animais explorem menos o ambiente no dia teste (segundo dia) quando comparado com o dia de treinamento (primeiro dia), em relação ao número de cruzamentos e erguidas.

Na Figura 16 gráfico A podemos observar que os grupos controle, Sham Sed e Sham-Ex, reduziram o número de cruzamentos, ou seja, exploraram menos o campo aberto no dia teste (Sham Sed treinamento: $32,21 \pm 3,3$ vs. Sham Sed teste: $20,43 \pm 4,5$ nº de cruzamentos, $p < 0,05$ e Sham-Ex treinamento: $31 \pm 3,67$ vs. Sham-Ex teste: $21,25 \pm 3,94$ nº de cruzamentos, $p < 0,05$). Os animais 2VO Sed não apresentaram diferença, ou seja, exploraram o ambiente no dia treinamento e no dia teste de forma similar (2VO Sed treinamento: $35,95 \pm 3,01$ vs. 2VO-Sed teste: $34,30 \pm 2,94$ nº de cruzamentos $p > 0,05$), porém os animais do grupo 2VO-Ex apresentaram redução na exploração do ambiente no dia teste como observado nos grupos controle Sham Sed e Sham-Ex (2VO-Ex treinamento: $41,50 \pm 3,56$ vs. $30,85 \pm 4,23$ nº de cruzamentos $p < 0,01$).

Os resultados do teste com o número de erguidas foi similar à análise anterior. Os animais do grupo Sham Sed e Sham-Ex (Sham Sed treinamento: $21,43 \pm 1,79$ vs. Sham Sed teste: $8,64 \pm 1,61$ nº de erguidas; $p < 0,001$ e Sham-Ex treinamento: $20 \pm 1,69$ vs. $11,7 \pm 1,2$ nº de erguidas; $p < 0,05$) exploraram menos no dia teste quando comparados com o dia de treinamento. Os animais do grupo 2VO Sed não apresentaram diferença significativa entre o dia de treinamento e o dia teste (2VO Sed treinamento: $17,71 \pm 1,51$ vs. 2VO-Sed teste: $15,06 \pm 1,42$ nº de erguidas; $p > 0,05$). No entanto, os animais 2VO-Ex reduziram a exploração do ambiente no dia teste quando comparados com o dia de treinamento (2VO-Ex: $25,54 \pm 2,20$ vs. 2VO-Ex teste: $18,62 \pm 3,77$ nº de erguidas; $p < 0,05$).

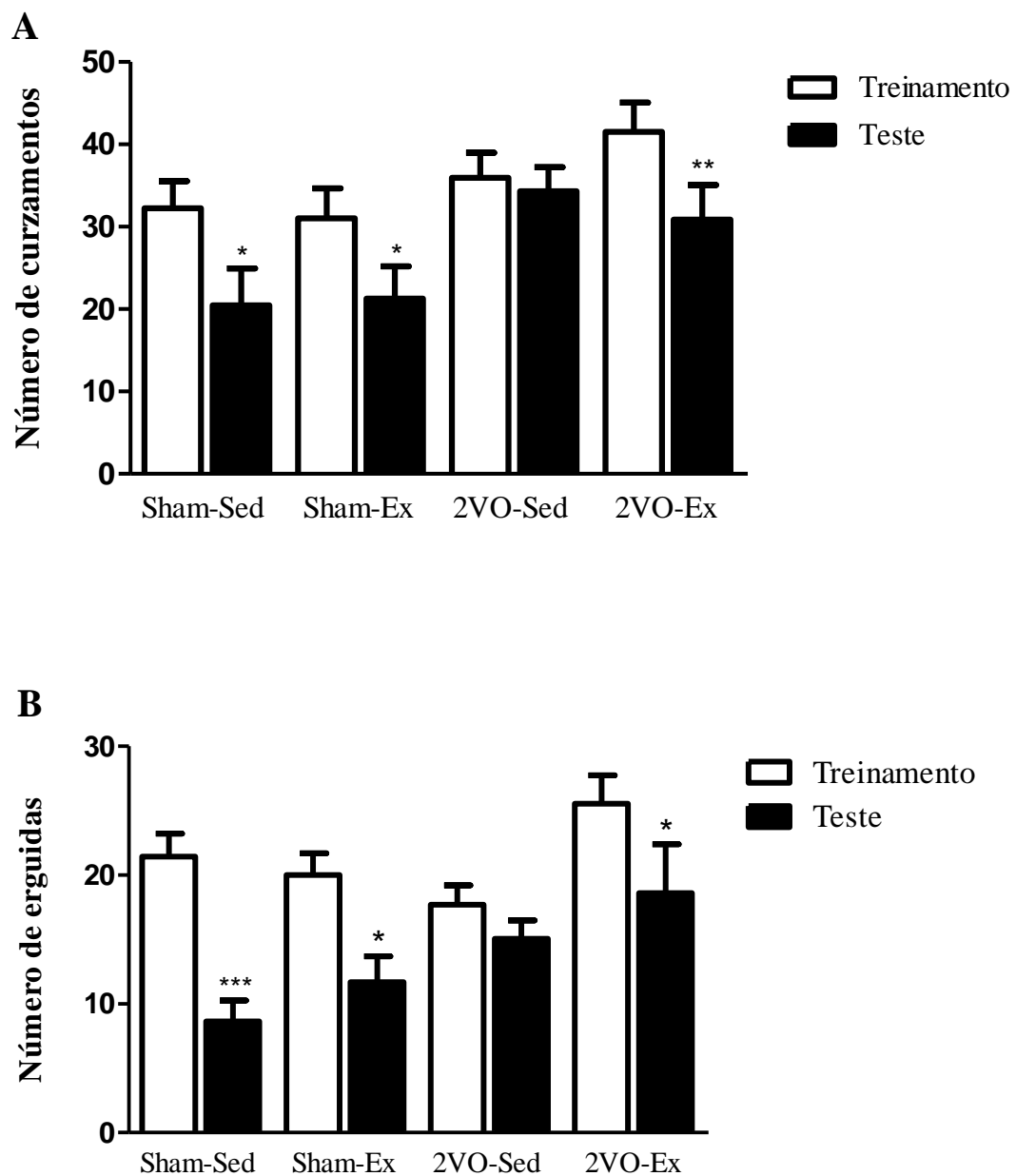


Figura 18: Análise da função cognitiva pelo teste de campo aberto. Os valores representam a média \pm E.P.M (n = 12-15 animais por grupo). A barra branca representa o número de cruzamentos ou erguidas durante a sessão treinamento e a barra preta representa o número de cruzamentos ou erguidas durante a sessão teste, 24h após a sessão treinamento. O gráfico A representa o número de cruzamentos e o gráfico B o número de erguidas no dia de treinamento e no dia teste. Sham Sed: animais submetidos à cirurgia Sham e sedentários; Sham-Ex: animais submetidos à cirurgia Sham e ao protocolo de exercício físico; 2VO Sed: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e sedentários e 2VO-Ex: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e ao protocolo de exercício físico.* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. dia de treinamento (teste-t de Student pareado).

6.6 O exercício físico moderado foi capaz de normalizar a densidade capilar funcional e reduzir o rolamento de leucócitos no cérebro

Após o teste cognitivo, foram iniciados os experimentos terminais nos animais como a microscopia intravital, na qual é feita a craniotomia do osso parietal direito para a análise da microcirculação cerebral. A administração de FITC acoplada ao dextran e rodamina 6G, permitiu a análise da densidade capilar funcional e da interação leucócito-endotélio no córtex cerebral, respectivamente. Após as 12 semanas de exercício físico ou sedentarismo, os resultados sugerem que os animais do grupo 2VO-Sed apresentaram rarefação capilar quando comparados com o grupo Sham Sed (2VO Sed: $295 \pm 14,9$ vs. Sham Sed: $366,3 \pm 23,11$ capilares por mm^2 ; $p < 0,05$ – Figura 17, gráfico A) e aumento no rolamento de leucócitos à parede vênular quando comparados com o grupo Sham Sed (2VO Sed: $6,75 \pm 0,79$ vs. Sham Sed: $3,35 \pm 0,60$ células por minuto; $p < 0,01$ – Figura 17, gráfico B). O exercício físico foi capaz de restaurar a densidade capilar funcional (2VO-Ex: $326 \pm 42,21$ vs. Sham Sed: $366,3 \pm 23,11$ capilares por mm^2 e vs. Sham-Ex; $p > 0,05$ - gráfico A) e reduzir o rolamento de leucócitos quando comparado com o grupo sedentário (2VO-Ex: $3,95 \pm 0,67$ células por minuto vs. 2VO Sed, $p < 0,05$ – Figura 17, gráfico C). Não foram encontradas diferenças em relação ao número de leucócitos aderidos à parede vênular (gráfico B).

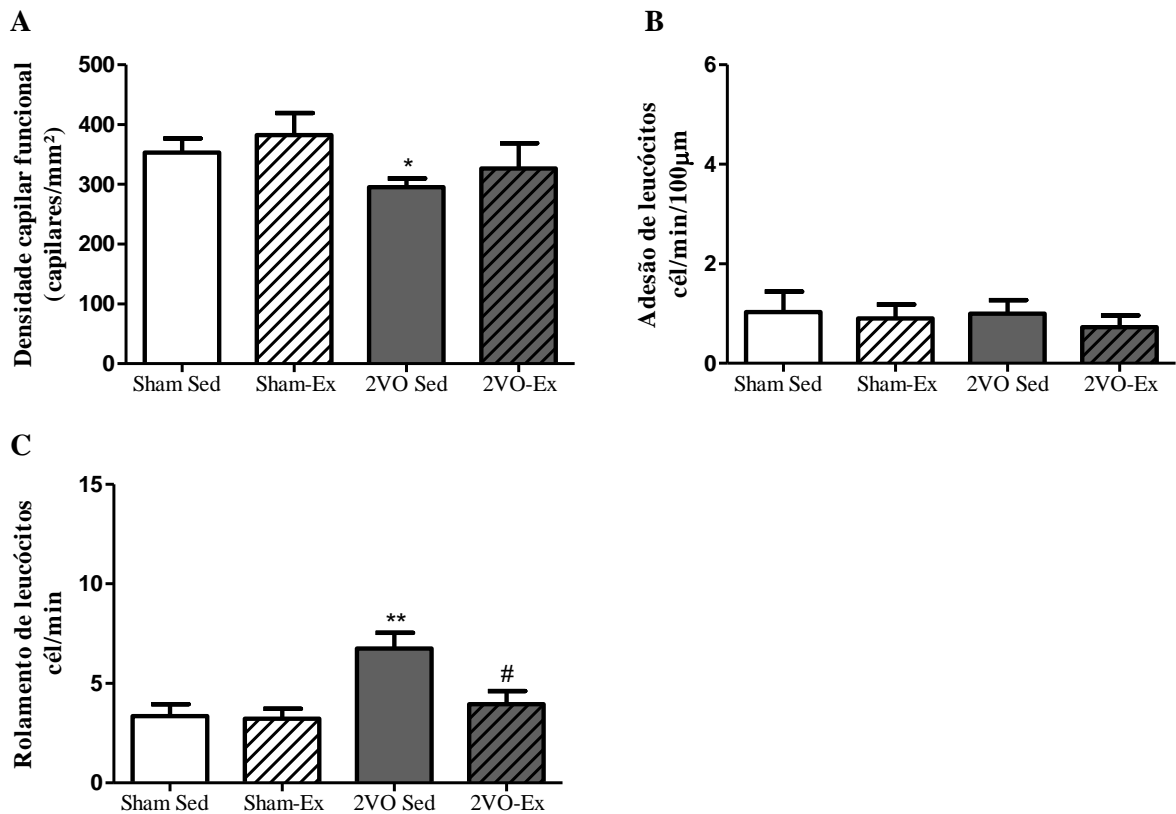


Figura 19: Análise da microcirculação do córtex cerebral pela microscopia intravital por epifluorescência. Os valores representam a média \pm E.P.M ($n = 8$ por grupo). O gráfico A representa a densidade capilar funcional, no gráfico B o número de leucócitos aderidos à parede venular e em C o rolamento de leucócitos em vênulas. Sham Sed: animais submetidos à cirurgia Sham e sedentários; Sham-Ex: animais submetidos à cirurgia Sham e ao protocolo de exercício físico; 2VO Sed: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e sedentários e 2VO-Ex: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e ao protocolo de exercício físico. Em A: * $p < 0,05$ vs. Sham Sed (teste-t de Student não pareado); em C ** $p < 0,01$ vs. Sham Sed e # $p < 0,05$ vs. 2VO Sed (ANOVA).

6.7 O exercício físico moderado não induziu alterações no fluxo sanguíneo microvascular cerebral

Após a microscopia intravital e utilizando a mesma janela craniana, foi medido o fluxo sanguíneo do córtex cerebral através do LSCI (Figura 18). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Sham Sed: $172,3 \pm 7,61$; Sham-Ex: $186,6 \pm$

11,6; 2VO-Sed: $168,7 \pm 7,07$ e 2VO-Ex: $178,6 \pm 4,13$ unidades arbitrárias de perfusão; $p > 0,05$).

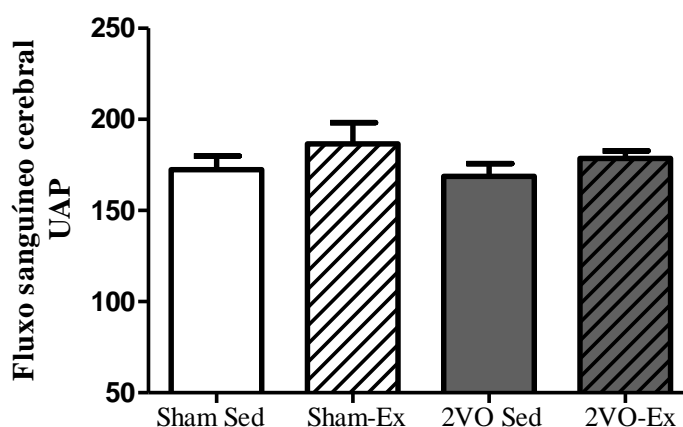


Figura 20: Análise do fluxo sanguíneo do córtex cerebral por fluxometria a laser speckle com contraste de imagem. Os valores representam a média \pm E.P.M de 8-10 animais por grupo. Sham Sed: animais submetidos à cirurgia Sham e sedentários; Sham-Ex: animais submetidos à cirurgia Sham e ao protocolo de exercício físico; 2VO Sed: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e sedentários e 2VO-Ex: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e ao protocolo de exercício físico. $p > 0,05$ ANOVA.

6.8 O exercício físico por 12 semanas altera a expressão de proteínas sinápticas

Neste trabalho, para corroborar os resultados do teste de campo aberto, analisamos o conteúdo de proteínas importantes na consolidação da memória, aprendizado e manutenção dos neurônios. Sendo assim, escolhemos a região do hipocampo que além de representar o centro armazenador de memórias, representa também uma importante região para a memória de habituação ao ambiente novo.

A Figura 19 ilustra o resultado do conteúdo proteico para sinaptofisina, PSD-95 e BDNF pela técnica de *Western Blot*. O exercício físico por 12 semanas foi capaz de aumentar a expressão proteica de sinaptofisina quando comparado com os animais sedentários (Sham-Ex: $1,87 \pm 0,31$ vs. Sham Sed: $1,077 \pm 0,19$ unidades arbitrárias e 2VO-Ex: $1,41 \pm 0,18$ vs. 2VO Sed: $0,85 \pm 0,12$ unidades arbitrárias; $p < 0,05$). Resultado similar foi encontrado para a PSD-95 no grupo de animais exercitados quando comparados com os animais sedentários (Sham-Ex: $1,38 \pm 0,28$ vs. Sham Sed: $0,69 \pm 0,1$ unidades arbitrárias e 2VO-Ex: $1,62 \pm 0,25$

vs. 2VO Sed: $0,70 \pm 0,12$ unidades arbitrárias; $p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças em relação ao BDNF (Sham Sed: $0,7 \pm 0,12$; Sham-Ex: $0,98 \pm 0,25$; 2VO-Sed: $0,74 \pm 0,12$ e 2VO-Ex: $0,76 \pm 0,15$ unidades arbitrárias; $p > 0,05$).

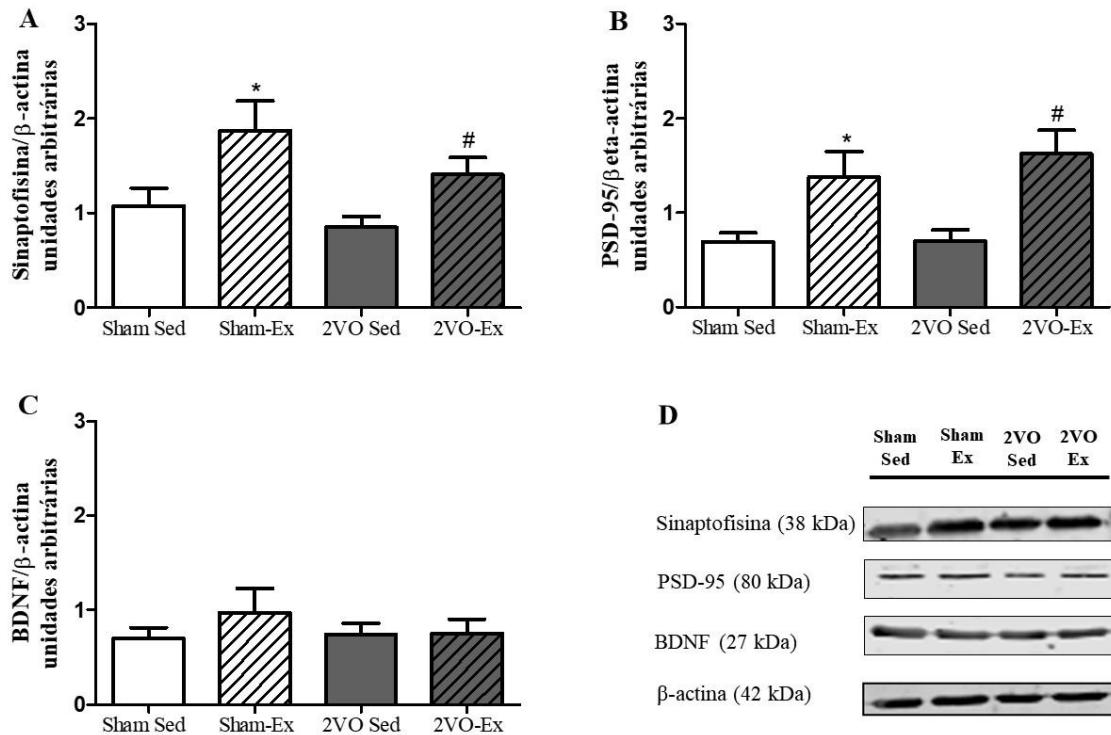
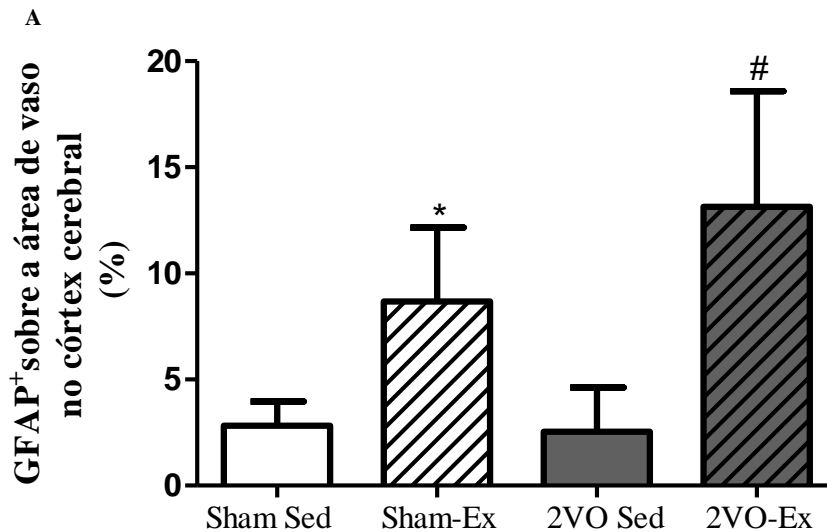


Figura 21: *Western blot* para sinaptofisina, PSD-95 e BDNF no hipocampo. Os valores representam a média \pm E.P.M de 6-8 animais por grupo. O gráfico A representa a expressão protéica de sinaptofisina, o gráfico B de PSD-95 e o gráfico C de BDNF. Em D estão as bandas das proteínas analisadas e do controle β -actina. Sham Sed: animais submetidos à cirurgia Sham e sedentários; Sham-Ex: animais submetidos à cirurgia Sham e ao protocolo de exercício físico; 2VO Sed: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e sedentários e 2VO-Ex: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e ao protocolo de exercício físico. Em A: * $p < 0,05$ vs. Sham Sed e # $p < 0,05$ vs. 2VO Sed (teste-t de Student não pareado); em B * $p < 0,05$ vs. Sham Sed (teste-t de Student não pareado) e # $p < 0,05$ vs. 2VO Sed (ANOVA).

6.9 O exercício físico precoce melhora a cobertura de astrócitos sobre os vasos do córtex cerebral de animais submetidos ao modelo de hipoperfusão cerebral crônica

Por meio da análise de imuno-histoquímica, foi possível analisar a cobertura de astrócitos sobre os vasos cerebrais, que representa um importante aspecto da unidade neurovascular. Como o estudo da microcirculação (densidade capilar funcional e interação leucócito-endotélio) e fluxo sanguíneo cerebral foi realizado na área cortical investigamos a relação vaso-astrócito também nesta área.

A Figura 20 demonstra que os animais submetidos ao treinamento físico moderado por 12 semanas aumentaram de forma significativa a cobertura de astrócitos nos vasos do córtex cerebral (Sham Sed: $2,83 \pm 0,56$ vs. Sham-Ex: $8,67 \pm 2,02$ e 2VO Sed: $2,54 \pm 1,20$ vs. 2VO-Ex: $13,14 \pm 3,15$ percentual de fluorescência sobre área de vaso; $p < 0,05$ – gráfico A). Na Figura 20 - B, é possível observar que os vasos (marcação IB4 - vermelho) dos animais exercitados estão mais cobertos pelos astrócitos (marcação GFAP - astrócitos) do que nos animais sedentários.



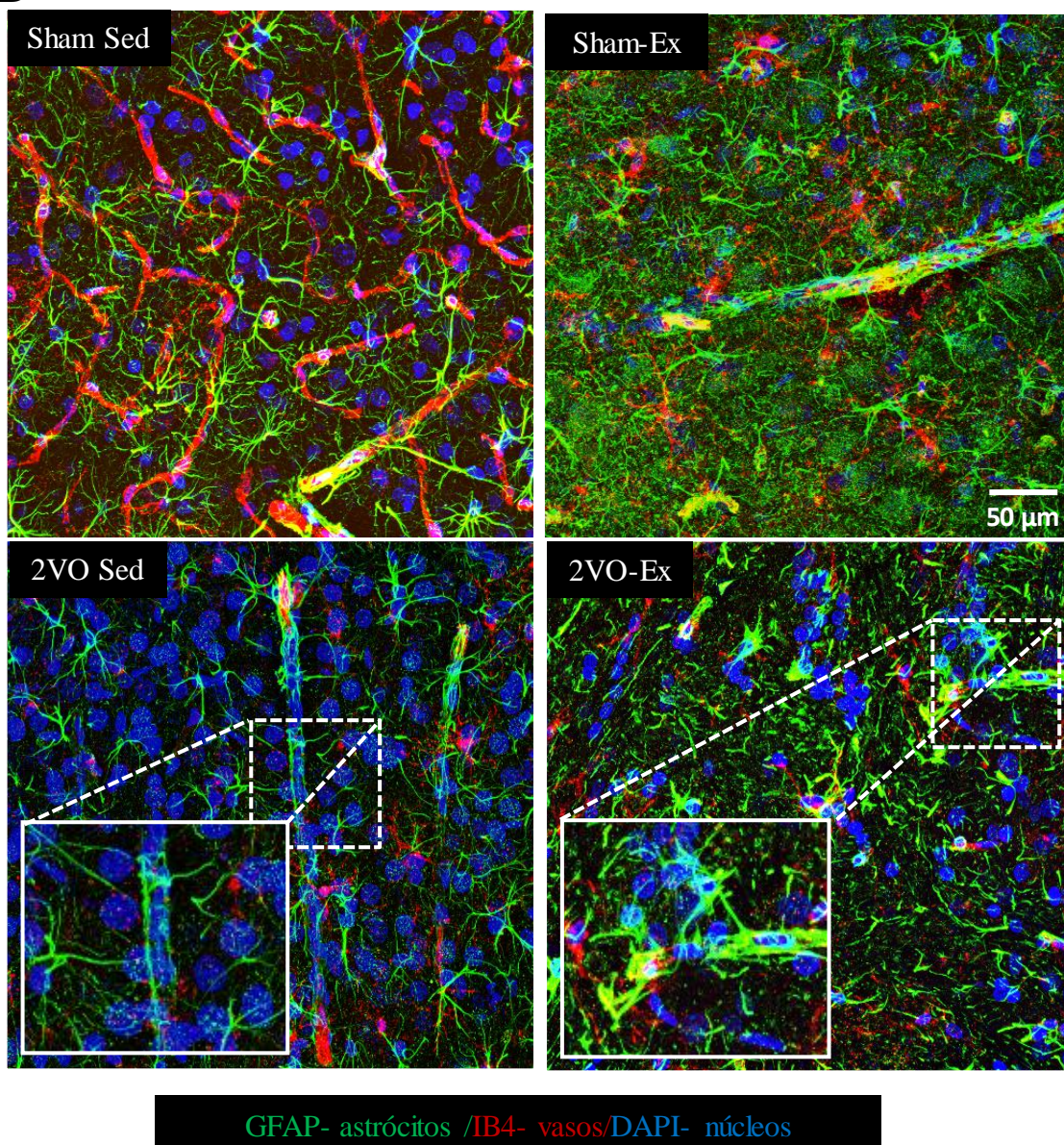
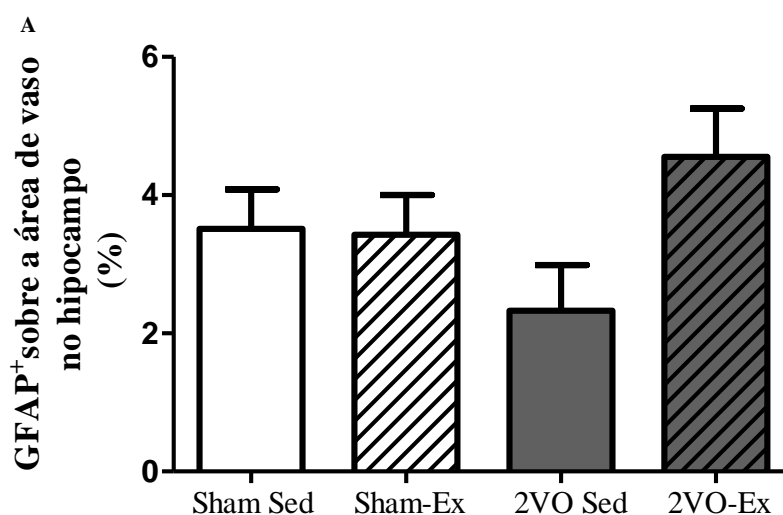
B

Figura 22: Resultados dos vasos cobertos por astrócitos no córtex cerebral. Em A, os dados representam a média \pm EPM de até 10 vasos por imagem de 3-4 animais por grupo. Em B, imagens de microscopia confocal representativas do gráfico referente à cobertura de astrócitos (GFAP+, em verde) em vasos do córtex cerebral (IB4, em vermelho) de ratos submetidos à 2VO e sedentários (2VO Sed) ou exercitados por 12 semanas (2VO-Ex) e seus respectivos controles (Sham Sed e Sham-Ex). Núcleo marcado com DAPI (azul). Sham Sed: animais submetidos à cirurgia Sham e sedentários; Sham-Ex: animais submetidos à cirurgia Sham e ao protocolo de exercício físico; 2VO Sed: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e sedentários e 2VO-Ex: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e ao protocolo de exercício físico. * $p < 0,05$ vs. Sham Sed e # $p < 0,05$ vs. 2VO Sed ANOVA.

6.10 O exercício físico não altera a cobertura de astrócitos sobre os vasos do hipocampo de animais submetidos ao modelo de hipoperfusão cerebral crônica

A análise da cobertura de astrócitos sobre os vasos também foi feita na região do hipocampo para complementar os resultados do teste cognitivo, das proteínas sinápticas e do BDNF.

Na Figura 21, observa-se que o exercício físico moderado por 12 semanas em animais com hipoperfusão cerebral crônica não alterou a cobertura de astrócitos em vasos do hipocampo (Sham Sed: $3,51 \pm 0,57$; Sham-Ex: $3,43 \pm 0,57$; 2VO Sed: $2,33 \pm 0,66$; 2VO-Ex: $4,55 \pm 0,7$ percentual de vasos cobertos por astrócitos; $p > 0,05$). Embora não tenhamos encontrado diferença significativa, a imagem B da Figura 21 demonstra qualitativamente a diferença de cobertura dos astrócitos entre os grupos sedentários e exercitados.



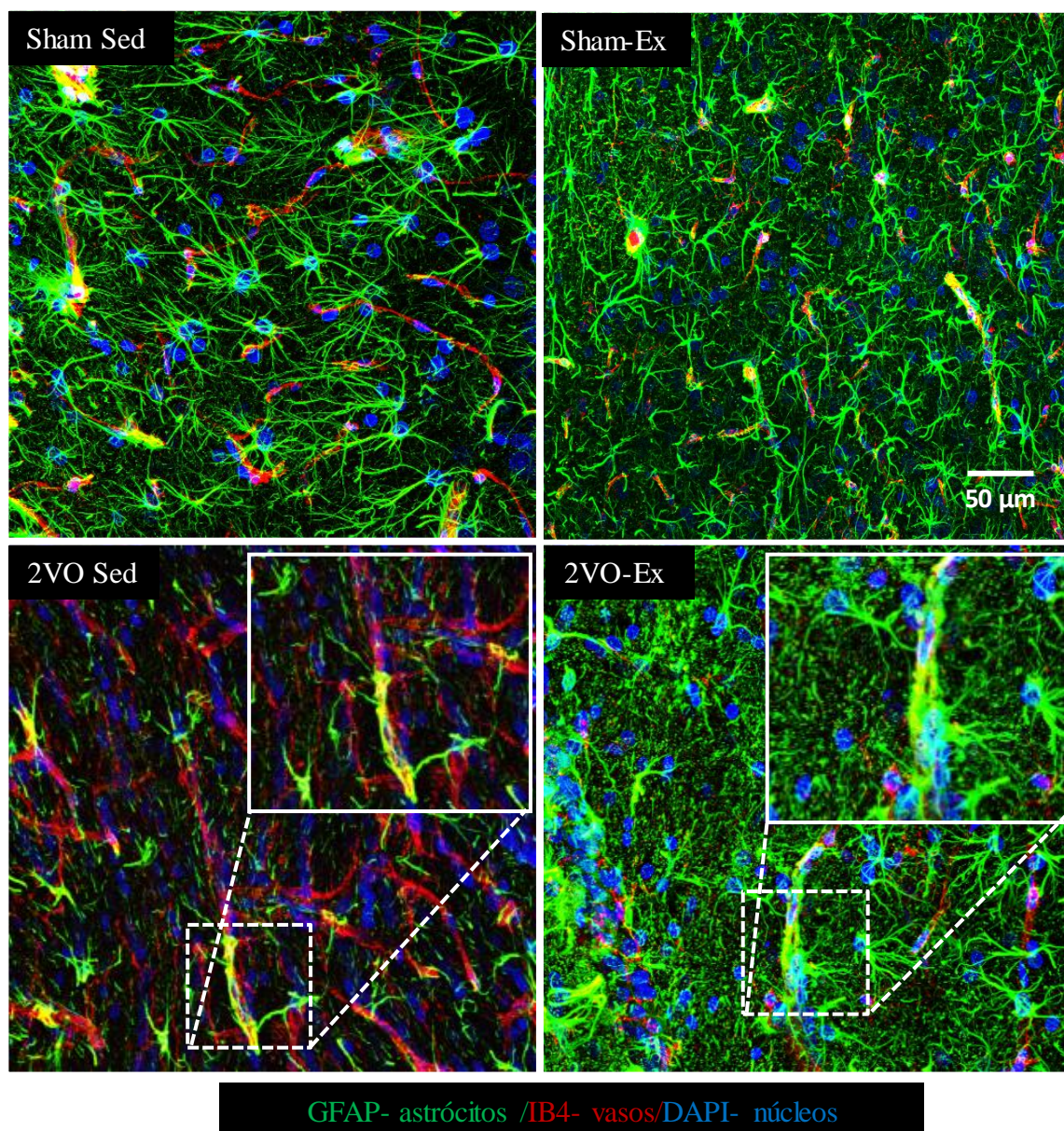
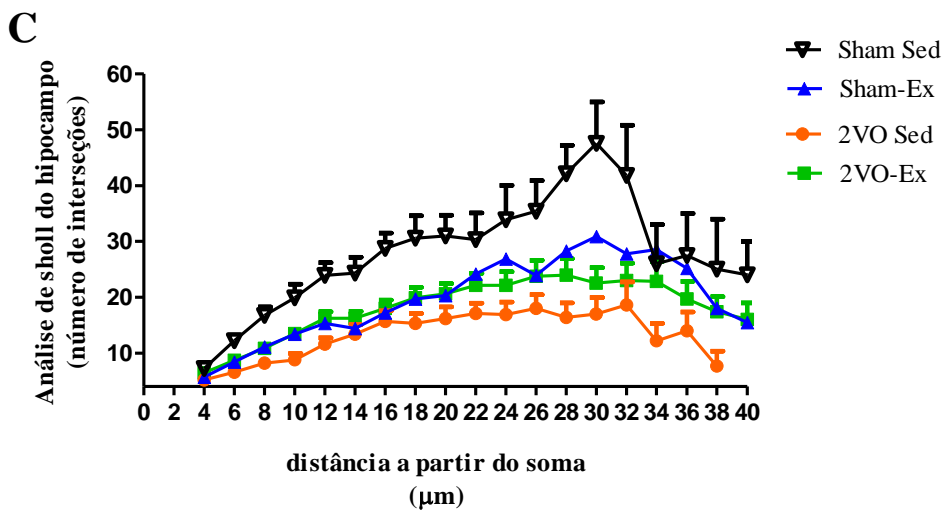
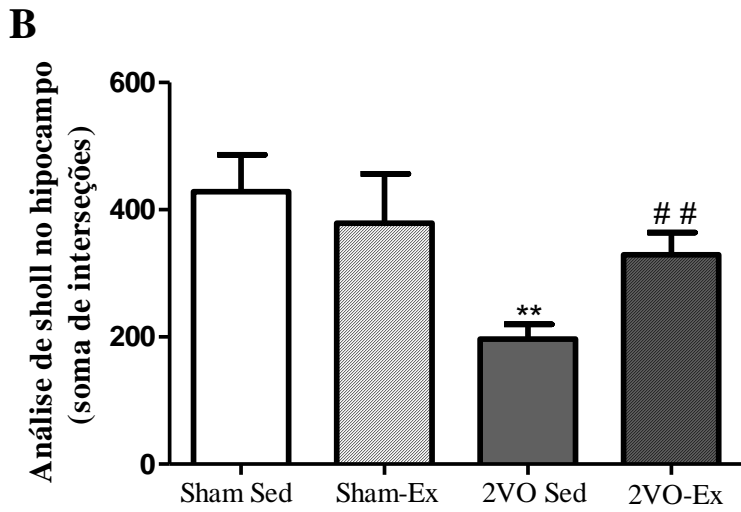
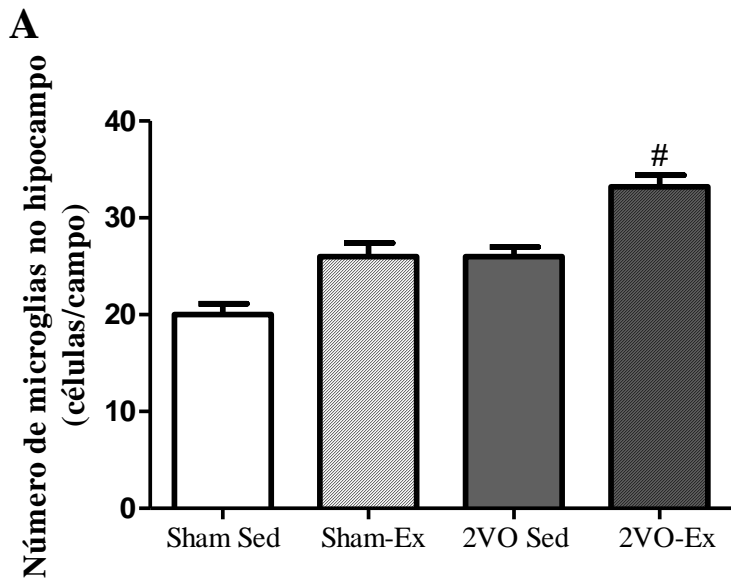
B

Figura 23: Resultados dos vasos cobertos por astrócitos na área CA1 do hipocampo. Em A, os resultados representam média \pm EPM de até 10 vasos por imagem de 3-4 animais por grupo. Em B, imagens de microscopia confocal representativas do gráfico referente à cobertura de astrócitos (GFAP+, em verde) em vasos do córtex cerebral (IB4, em vermelho) de ratos submetidos à 2VO e sedentários (2VO Sed) ou exercitados por 12 semanas (2VO-Ex) e seus respectivos controles (Sham Sed e Sham-Ex). Núcleo marcado com DAPI (azul). Sham Sed: animais submetidos à cirurgia Sham e sedentários; Sham-Ex: animais submetidos à cirurgia Sham e ao protocolo de exercício físico; 2VO Sed: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e sedentários e 2VO-Ex: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e ao protocolo de exercício físico. $p > 0,05$ ANOVA.

6.11 O exercício físico protege a ativação microglial no hipocampo de animais submetidos ao modelo de hipoperfusão cerebral crônica

Utilizando também a técnica de imuno-histoquímica, mas agora com a marcação de Iba-1, foi possível investigar o efeito do exercício físico sobre as microglias. Observamos que os animais do grupo com hipoperfusão cerebral crônica e exercitados apresentaram aumento no número de microglias quando comparado com o seu controle sedentário (2VO-Ex: $33,20 \pm 1,2$ vs. 2VO-Sed: 26 ± 1 n^o de microglias; $p < 0,05$ – Figura 22 A).

No entanto, verificamos que o perfil da microglia estava alterado entre os animais exercitados e os sedentários. Na Figura 22 -D, podemos observar que no grupo 2VO-Sed as microglias apresentam morfologia amebóide e poucas ramificações, sugerindo perfil ativado “M1” – pró-inflamatório, ou seja, a hipoperfusão cerebral crônica promoveu a ativação das microglias. Quando observamos as microglias do grupo 2VO-Ex, encontramos microglias sem a morfologia amebóide e com mais ramificações, sugerindo perfil “M2” – anti-inflamatório, ou seja, o exercício físico foi capaz de proteger da ativação da microglia. A análise quantitativa deste resultado está representada nos gráficos da Figura 22 B e C, onde há um aumento no número de ramificações no grupo 2VO-Ex quando comparado com o grupo 2VO-Sed (2VO-Ex: $329,10 \pm 35,30$ vs. 2VO-Sed: $196,6 \pm 23,34$ ramificações da microglia a partir do soma; $p < 0,01$ – Figura 22 B e C).



D

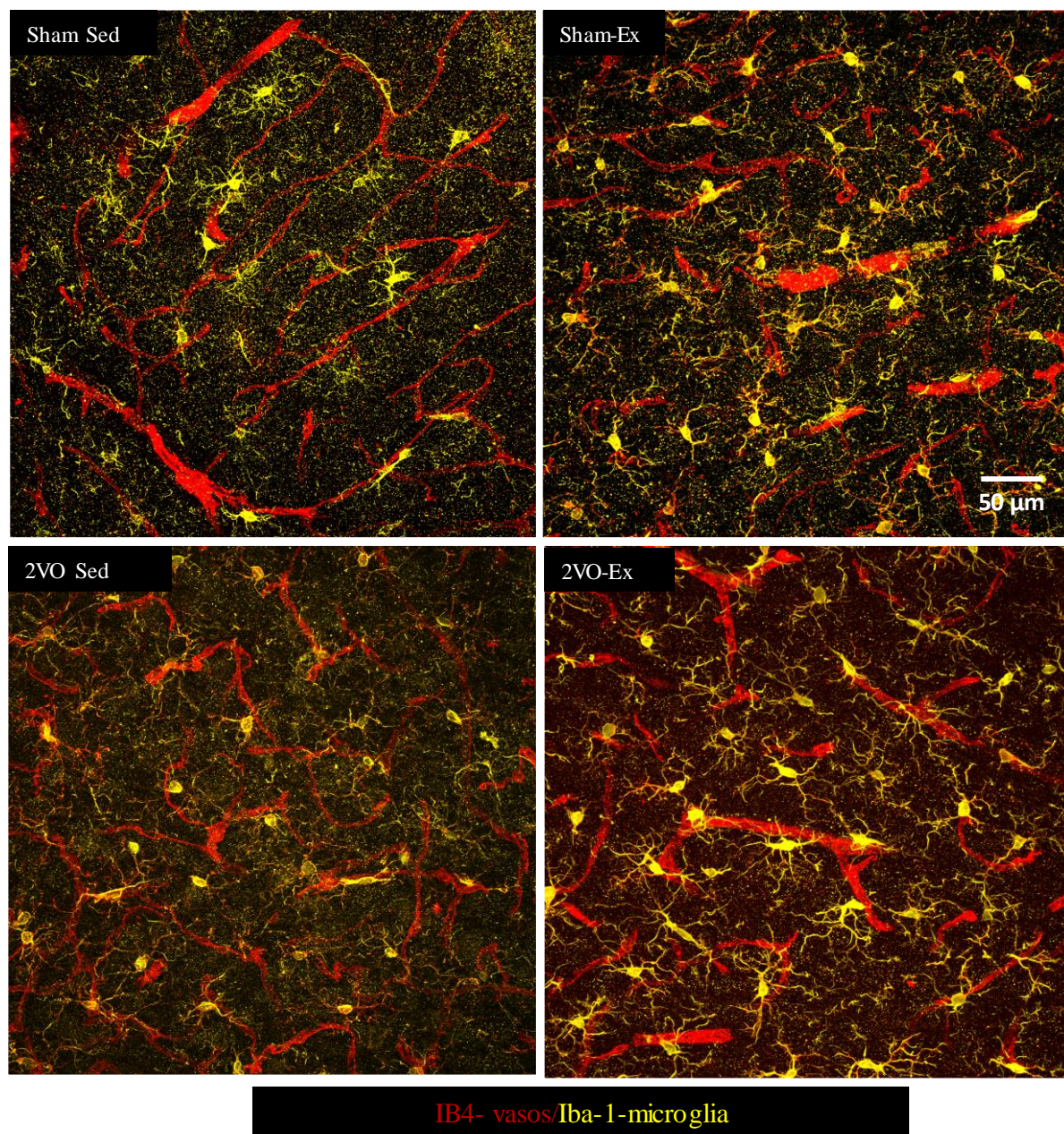


Figura 24: O exercício físico aumenta o número de microglias ramificadas na área CA1 do hipocampo. Os dados representam a média \pm EPM de até 40 microglias por grupo de 3 animais. Em A, número de microglias no hipocampo, B-C quantidade de ramificações da microglia; em D imagens da microscopia confocal representativas do gráfico referente à análise sholl de processos de microglias no hipocampo de ratos submetidos à 2VO e sedentários (2VO Sed) ou exercitados por 12 semanas (2VO-Ex) e seus respectivos controles (Sham Sed e Sham-Ex). Sham Sed: animais submetidos à cirurgia Sham e sedentários; Sham-Ex: animais submetidos à cirurgia Sham e ao protocolo de exercício físico; 2VO Sed: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e sedentários e 2VO-Ex: animais submetidos à hipoperfusão cerebral e ao protocolo de exercício físico. * $p < 0,05$ vs. Sham Sed; # $p < 0,05$ e # $p < 0,01$ vs. 2VO-Sed ANOVA.

7. DISCUSSÃO

Os resultados da primeira parte do presente estudo demonstraram que a hipoperfusão cerebral apresentou efeitos sobre a densidade capilar funcional e o rolamento de leucócitos à parede vênular cortical de forma mais pronunciada a curto prazo, 24h e 72h após a 2VO, do que a longo prazo, 12 semanas, quando comparados com o grupo controle jovem. No entanto, esses resultados quando comparados com o grupo controle idoso não demonstraram diferença estatística, principalmente a longo prazo.

Em relação ao FSC, observamos que os efeitos da 2VO foram similares ao longo do tempo e que as alterações presentes no grupo 2VO crônico não apresentaram diferença estatística quando comparado com o grupo controle idoso, sugerindo que a fase crônica do modelo é similar com o que ocorre com os animais idosos, no que diz respeito à variáveis microcirculatórias.

Os vasos menores do cérebro, incluindo as arteríolas, sofrem alterações progressivas relacionadas à idade, que modificam a perfusão sanguínea podendo ocasionar em infartos lacunares (lesões geralmente <1 cm) e microinfartos (101). Estudos que utilizaram a 2VO como modelo de DV, reportaram danos em capilares do hipocampo. (102), como aumento de capilares com depósitos de colágeno na membrana basal e pericitos em processo de degeneração (8, 102, 103). Anormalidades nos capilares incluindo capilares tortuosos, bem como vasos colapsados, foram evidentes, particularmente nos casos de DV e na demência pós AVE isquêmico, sugerindo que a hipoperfusão cerebral ou as alterações isquêmicas são provavelmente a causa de anormalidades microvasculares.

No presente trabalho, as alterações na densidade capilar cerebral foram acompanhadas pela redução do FSC. Resultados da literatura demonstraram que 2,5h após a hipoperfusão cerebral foi encontrado redução de perfusão tecidual de 60% no núcleo caudado, 61-75% em regiões corticais e 48% no hipocampo quando comparada com o grupo controle (104). No nosso trabalho, encontramos redução de 27% até 72 h após a hipoperfusão cerebral. Utilizando o laser doppler, Tomimoto et al. encontraram redução similar, em torno de 30%, no FSC entre 24 e 72h de 2VO (105) e Otori et al. encontraram reduções de 33-58% no FSC após 48 h de 2VO em áreas do córtex, corpo caloso e substância branca (15).

Embora existam relatos de rarefação relacionada ao envelhecimento das arteríolas no músculo cardíaco e esquelético, poucos estudos analisaram os efeitos do envelhecimento na

densidade de arteríolas cerebrais. Bell e Ball observaram em regiões do hipocampo de idosos que o envelhecimento afetou a microcirculação cerebral, na qual o diâmetro de capilares e arteríolas aumentou significativamente com a idade, e em contrapartida a densidade capilar diminuiu, mas a das arteríolas aumentou significativamente (106). Murugesan et al. encontraram perda capilar significativa em regiões distintas do cérebro em ratos idosos: córtex ($19,26 \pm 6,7\%$), hipocampo ($26,38 \pm 5,63\%$) e corpo caloso/ substância branca ($34,5 \pm 10,86\%$) quando comparados com animais jovens (107). Outros trabalhos também encontraram redução na densidade capilar em animais idosos quando comparados tanto em ratos jovens (108, 109) quanto humanos (110, 111).

No presente trabalho, curiosamente, a redução do fluxo sanguíneo microvascular cerebral não foi acompanhada pela rarefação de capilares do córtex cerebral do grupo controle idoso. Trabalhos anteriores relataram diminuição, sem alteração ou aumento da densidade capilar cerebral com a idade (8, 112), por meio de técnicas histológicas, e também não observaram diferença no número de arteríolas do córtex cerebral de ratos com 3 e 24 meses (113). Sendo assim, sugerimos que as técnicas, regiões e idade dos animais possam explicar as diferenças encontradas nos nossos resultados.

A disfunção endotelial é considerada um dos mecanismos centrais das alterações vasculares estruturais e funcionais em doenças neurodegenerativas. No modelo de 2VO, já foi observado que os marcadores de ativação endotelial aumentam um dia pós-oclusão até 28 dias, com pico aos três dias (114). Utilizando um sistema de micromolas (*microcolis*) nas carótidas comuns para induzir a hipoperfusão cerebral, Yata et al. encontraram aumento no rolamento e adesão de leucócitos em vênulas da superfície pial após 24 horas, 1 e 2 semanas de hipoperfusão cerebral sugerindo que a ativação de leucócitos pode ser o primeiro passo para a resposta ao estresse de toda a unidade neurovascular à hipoperfusão cerebral crônica (115).

Os resultados do nosso trabalho também sugerem o aumento no número de rolamento de leucócitos à parede vênular no córtex cerebral de animais 2VO, a curto prazo, 24 e 72 horas e a longo prazo, 12 semanas. Embora não tenhamos analisado as moléculas de interação leucócito-endotélio, como E-selectina, P-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, estudos anteriores demonstraram que as moléculas de adesão estavam mais expressas no primeiro e segundo mês após a 2VO no hipocampo, porém no quarto mês estavam mais expressas em células da glia no hipocampo (116).

Em conjunto, sugerimos que modelo de hipoperfusão cerebral crônica induz aumento da interação leucócito-endotélio na microcirculação cerebral de ratos semelhantes às aquelas observadas em animais idosos. Esses dados demonstram que as interações leucócito-endotélio vascular, na densidade capilar funcional e FSC não ocorrem apenas na fase aguda da hipoperfusão, mas também na fase crônica após isquemia cerebral transitória e permanente. O estudo deste modelo experimental de hipoperfusão cerebral crônica pode ser aprofundado visando compreender os mecanismos moleculares envolvidos no processo de inflamação microvascular que ocorre no envelhecimento.

Após a discussão das alterações microcirculatórias do modelo escolhido, investigamos o efeito do treinamento físico na cognição e em variáveis neuroinflamatórias, microcirculatórias e hemodinâmicas. De início, observamos que os animais com hipoperfusão cerebral apresentaram aumento na pressão arterial sistólica, 48 horas (grupo 2VO) e 12 semanas (grupo 2VO Sed) após a cirurgia de oclusão das carótidas comuns e, que o treinamento físico iniciado durante a fase aguda da isquemia, três dias após 2VO, foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica ao final do protocolo.

O aumento na pressão arterial sistólica se explica pela acentuada queda no FSC que ocorre após a oclusão, que por sua vez, reduz o estiramento das paredes arteriais resultando em redução da estimulação dos barorreceptores que, respondem à queda da pressão arterial aumentando o tônus simpático, e conseqüentemente o aumento da pressão arterial sistêmica (10). Estudos anteriores que analisaram o comportamento da pressão arterial média verificaram aumentos significativos após a 2VO tanto em curto prazo (117) quanto em longo prazo (15). Corroborando os nossos resultados, Farkas e colaboradores descreveram um aumento de 10 a 20 mmHg na pressão arterial sistólica a partir de 24 horas após a 2VO, persistindo até 9 semanas (10). Nossos resultados reforçam os demais trabalhos na literatura e ressaltam a importância do treinamento físico como abordagem terapêutica não farmacológica. Evidências demonstram que o exercício físico regular, especialmente o exercício aeróbio, pode aumentar o relaxamento vascular (118), reduzir a pressão arterial em modelos de síndrome metabólica (119), hipertensão (120) e em estudos com humanos. (121).

Além de observamos o efeito positivo do exercício físico sobre a pressão arterial, verificamos que o mesmo foi capaz de normalizar a densidade capilar funcional no córtex cerebral no grupo 2VO-Ex. Estudos anteriores mostraram que o treinamento físico pode induzir um aumento na densidade capilar cortical e levar ao crescimento de novos capilares

no cérebro, especialmente no córtex motor (122-124). O exercício físico por 4 meses em ratos idosos foi capaz de aumentar o volume, o comprimento do capilar e a área de superfície total de capilares no córtex cerebral (125). Em conjunto, esses dados corroboram o presente trabalho, no qual observamos que no grupo 2VO-Ex os valores da densidade capilar funcional retornaram aos valores normais.

O achado de que o FSC se normaliza por um período de meses no modelo 2VO, mesmo que a oclusão seja permanente, indica que os mecanismos compensatórios ou adaptativos estão ativados. O fluxo sanguíneo compensatório pode ser fornecido através da dilatação arterial, o recrutamento de capilares não perfundidos e pela angiogênese. Em apoio a essas sugestões, evidências experimentais foram adquiridas sobre o aumento no diâmetro das artérias na base do cérebro. Os vasos posteriores que contribuem para o círculo de Willis (por exemplo, a artéria basilar, a artéria cerebral posterior e a artéria comunicante posterior) exibiram um diâmetro *post mortem* consideravelmente aumentado 15 semanas - 6 meses após o início da 2VO (126, 127). Na literatura, estudos descreveram recuperação do FSC a partir da 1ª semana (15) e o retorno aos níveis basais entre 8 semanas e seis meses após a 2VO (15, 126, 128). Estudos que avaliaram a dinâmica do FSC após a 2VO, demonstraram que os valores do fluxo podem retornar aos níveis basais entre 8 e 12 semanas assim como, outros trabalhos demonstraram a recuperação apenas após 5 meses do evento isquêmico. No entanto, nenhum desses estudos avaliou a densidade capilar cerebral, que é considerado um parâmetro incontestável de nutrição tecidual (15, 126, 129, 130).

De fato, não encontramos diferença entre os grupos em relação à perfusão tecidual provavelmente devido aos mecanismos compensatórios mais pronunciados nesta fase. É importante ressaltar que a medida do fluxo microvascular cerebral pela técnica de LSCI inclui todos os vasos da microcirculação (capilares, arteríolas e vênulas), e inclusive vasos mais calibrosos da membrana pial e que a microscopia intravital é uma técnica incontestável para a medida do número de capilares por mm² de tecido. Sendo assim, observamos que houve uma recuperação do fluxo de todos os vasos da superfície microvascular analisada pelo LSCI, no entanto, ao nível dos capilares a rarefação foi mantida, mas o exercício físico moderado por 12 semanas foi capaz de minimizar o efeito da 2VO. O aumento da densidade de capilares devido à angiogênese, o surgimento de novos capilares a partir de vasos preexistentes, é um mecanismo pelo qual o exercício melhora a função cerebral (122).

De Jong et al., observaram que o desempenho cognitivo de ratos submetidos à 2VO correlacionou-se estreitamente com a morfologia dos capilares na área CA1 do hipocampo, sugerindo que a integridade capilar é um dos importantes determinantes da função cerebral (102). De fato, uma correlação positiva entre cognição e a nutrição cerebral foi demonstrada em vários estudos (131). As memórias de longo prazo podem ser divididas em associativas e não associativas dependendo dos mecanismos necessários para sua formação. As memórias associativas são baseadas na aquisição de uma ligação preditiva entre um evento específico e um estímulo e as memórias não associativas são adquiridas quando a exposição repetida ou contínua a um novo estímulo altera as respostas comportamentais. Ambas as memórias requerem a participação do hipocampo (132, 133). Uma das tarefas elementares de aprendizado não associativo é a da habituação comportamental a um novo ambiente.

No presente estudo, a memória de habituação foi avaliada através do teste de campo aberto, no qual há duas sessões de 5 minutos: a de treinamento e a de teste, que acontece 24 horas depois da primeira (90). Os nossos resultados sugerem que os animais com hipoperfusão cerebral crônica e sedentários (2VO Sed) não modificaram a sua resposta exploratória quando foram apresentados a um novo ambiente, ou seja, na sessão teste eles exploraram tanto quanto no dia anterior demonstrando não terem consolidado a memória. A disfunção cognitiva analisada por outros testes como o labirinto aquático de Morris (*Morris water maze*) ou as tarefas do labirinto radial (*radial arm maze tasks*) foi amplamente relatada nesse modelo durante a fase crônica (134, 135).

Diferente do grupo sedentário com hipoperfusão cerebral crônica, aquele grupo submetido ao exercício físico (2VO-Ex) explorou menos o ambiente na sessão teste quando comparado com a sessão de treinamento. Confirmando nossos achados, no estudo de Choi et al. foi demonstrado que o exercício físico aeróbio iniciado na 3ª semana após a 2VO e mantido por 4 semanas foi capaz de reduzir o prejuízo cognitivo e aumentar a neurogênese no hipocampo (136). Cechetti et al. também demonstraram que o exercício físico moderado iniciado antes da hipoperfusão cerebral e mantido depois ou iniciado após a hipoperfusão cerebral foram capazes de proteger a função cognitiva na fase crônica (83).

No modelo de 2VO, o teste de campo aberto é comumente utilizado para medir a atividade locomotora e também para adaptar os animais para o teste de reconhecimento do objeto novo, já que se utiliza o mesmo equipamento (13, 137). No entanto, trabalhos anteriores demonstraram que o teste de campo aberto é uma alternativa simples e acessível

para investigar a função cognitiva. Com o objetivo de investigar a memória de habituação à um ambiente novo, o trabalho conduzido por Reis et al. (138), demonstrou que animais com malária cerebral apresentaram déficit cognitivo 15 e 30 dias após a infecção. O teste de campo aberto também foi utilizado para investigação de alvos moleculares específicos sobre a formação de memória a curto prazo em ratos (90). Em um outro trabalho, o teste foi aplicado em ratos submetidos à 2 ou 8 semanas de exercício físico moderado demonstrando melhora na função locomotora e na memória de habituação (139).

Neste trabalho, optamos pelo teste de campo aberto, pois além de ser usado para avaliar a memória (90, 138, 140), a investigação da disfunção cognitiva com base em testes de memória espacial, que é frequentemente avaliada com pistas visuais, colocam em xeque esses resultados haja vista que a hipoperfusão cerebral crônica impacta também o sistema visual, induzindo isquemia na retina causando prejuízos na visão e até a perda total (141-143). Essa observação não invalida os resultados anteriores, no entanto faz-se necessário apresentar essa discussão.

Embora os mecanismos moleculares exatos pelos quais o treinamento físico afeta a função cerebral não sejam claros, sugere-se a ativação de vias celulares e moleculares contribuem para a neuroproteção. A regulação positiva da expressão de fatores neurotróficos, como a sinaptofisina, marcador pré-sináptico; PSD-95, marcador pós-sináptico e BDNF, regulador nos processos de neurogênese, como diferenciação e sobrevivência neuronal, podem ajudar na compreensão dos efeitos induzidos pelo exercício físico.

Neste trabalho, examinamos se a abordagem com o exercício físico logo após a hipoperfusão cerebral modificaria a expressão de proteínas envolvidas com a plasticidade sináptica e neurogênese. Pela técnica de *Western blot*, observamos que o exercício físico moderado por 12 semanas foi capaz de aumentar o conteúdo proteico de sinaptofisina e PSD-95. Embora não tenhamos encontrado aumento significativo para o BDNF, trabalhos anteriores demonstraram que o exercício aeróbio moderado ou intenso por 12 semanas em adolescentes foi capaz de induzir aumento de BDNF no soro e melhora na memória de trabalho no grupo com exercício intenso (144). Trabalhos experimentais também demonstraram que o exercício físico aeróbio foi capaz de aumentar os níveis de sinaptofisina, PSD-95 e BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal (78, 145, 146).

A inflamação microvascular, como descrito anteriormente, é uma característica comum dos modelos de hipoperfusão com marcadores de inflamação crônica e ativação

endotelial associado a alterações progressivas. Ainda não se sabe se a inflamação é a principal causa do impacto cognitivo em doenças cerebrovasculares e se isso é desencadeado por processos intrínsecos ou sistêmicos. Porém, a interrupção da interação entre células da unidade neurovascular (células endoteliais, astrócitos, pericitos e neurônios) provavelmente contribuem para a fisiopatologia. (147).

Microglias são células imunes residentes no SNC que participam ativamente da homeostase neuronal e da patologia neural adulta. Em condições fisiológicas normais, a microglia “verifica” o microambiente e se comunica bidirecionalmente com os neurônios. No entanto, durante uma injúria por infecção, trauma ou isquemia cerebral, a microglia muda rapidamente sua morfologia de células ramificadas para células reativas com processos espessados e retraídos, adquirindo um formato mais arredondado (ameboide). E, a ativação microglial crônica é uma característica importante de muitas doenças neurodegenerativas. A microglia comprometida e ativada pode contribuir significativamente para a progressão da doença (148, 149). Assim, a regulação da ativação microglial tem sido objeto de intensivos esforços de pesquisa.

A resposta neuroinflamatória glial e o acúmulo de proteínas (β A e Tau) são duas características proeminentes em doenças neurodegenerativas, sendo correlacionada com a disfunção cognitiva durante o envelhecimento. Resultados recentes demonstraram que as microglias estavam ativadas em animais com hipoperfusão cerebral crônica (150). A utilização do exercício físico como abordagem terapêutica vem demonstrando atenuar de forma significativa a ativação da microglia no envelhecimento (151-153). A melhora da função cognitiva e a transformação do fenótipo microglial de M1 pró-inflamatório para o M2 anti-inflamatório, foi demonstrada após 28 dias de exercício físico em ratos com hipoperfusão cerebral crônica (154). Estes resultados apoiam os dados encontrados neste trabalho, no qual as microglias dos animais com hipoperfusão cerebral crônica e sedentários apresentaram ativação, ou seja, morfologia amebóide e pró-inflamatória e o treinamento físico moderado reduziu esta ativação e foi capaz de aumentar o número de ramificações da microglia. As microglias, quando ramificadas, estão “monitorando” o microambiente para responder prontamente a um evento patológico, configurando o fenótipo anti-inflamatório.

Resultados de outros grupos indicam que o exercício físico por 8 semanas antes da manobra de 2VO, foi capaz de reduzir a ativação de microglias e de astrócitos, sendo acompanhada de redução de apoptose neuronal (155, 156). Sendo assim, além das análises

das microglias, estudamos o efeito tanto da hipoperfusão cerebral crônica quanto do exercício físico sobre os astrócitos. Essas células fazem parte da unidade neurovascular e da BHE desempenhando papel chave para a estrutura da BHE, comunicação com os neurônios e homeostase do glutamato (157).

Trabalhos recentes demonstraram que o exercício físico foi capaz de aumentar níveis de GFAP (marcador de astrócitos) no córtex e hipocampo de animais (158, 159). A análise do estado morfológico dos astrócitos de animais exercitados sugere que essas células apresentam maiores ramificações (processos astrocíticos) quando comparados com animais sedentários (159). Em um trabalho publicado recentemente, foi observado um aumento gradual no número de processos astrocíticos durante o protocolo de exercício físico, em diferentes áreas cerebrais de camundongos (160).

No presente trabalho por meio da imuno-histoquímica e da análise de sincronismo de janela, foi possível quantificar o recobrimento dos astrócitos sobre os vasos, variável importante no estudo da unidade neurovascular. Os nossos resultados demonstraram que o exercício físico iniciado três dias após a hipoperfusão cerebral e mantido por 12 semanas foi capaz de aumentar o número de processos astrocíticos recobrimdo os vasos, principalmente no córtex cerebral. Este resultado ressalta o papel importante do exercício físico sobre a unidade neurovascular, como também sobre a BHE. A cobertura dos astrócitos sobre os vasos ainda é pouco estudada, no entanto, algumas evidências sugerem que pelo menos durante o desenvolvimento, os astrócitos interagem com as células endoteliais para facilitar a angiogênese (161).

A ideia de que o aumento de astrócitos é sempre um fenômeno negativo vem sendo contestada e, em muitos casos, essas alterações observadas devem ser interpretadas com outros parâmetros. Considera-se que os astrócitos estabelecem um ambiente adequado para o funcionamento dos neurônios e que a quantidade e a morfologia dos astrócitos podem refletir um aumento substancial no metabolismo astrogliar e na síntese de proteínas sinápticas, consistentes com a hipertrofia celular saudável em resposta ao aumento das demandas fisiológicas, indicando a importância destas células na plasticidade neuronal e na regulação da microcirculação cerebral (162, 163). Estas afirmativas vão ao encontro de nossos resultados, já que o aumento dos processos astrocíticos encontrados nos animais do grupo exercitado foi acompanhado pela redução da ativação da microglia, o aumento das proteínas sinápticas,

sinaptofisina e PSD-95, a normalização da microcirculação cerebral e a melhora da função cognitiva.

Portanto, as alterações microcirculatórias e inflamatórias cerebrais, importantes no processo neurodegenerativo, são desencadeadas na fase inicial da hipoperfusão cerebral e mantidas durante a fase crônica. Sugerimos que o exercício físico moderado iniciado durante a fase aguda da hipoperfusão cerebral e mantido durante 12 semanas foi capaz de induzir melhoras significativas na inflamação cerebral e na cognição, ressaltando o papel neuroprotetor do exercício físico.

8. CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- O modelo de hipoperfusão cerebral é capaz de gerar danos microcirculatórios e inflamatórios a curto (24 e 72 horas) e longo prazo (12 semanas);

- O modelo de hipoperfusão cerebral crônica, 12 semanas, apresenta alterações similares quando comparado com animais idosos;

- O exercício físico moderado por 12 semanas e iniciado logo após a isquemia cerebral, fase mais impactada pelo processo inflamatório, foi capaz de normalizar a densidade capilar funcional cerebral, reduzir o rolamento de leucócitos em vênulas cerebrais, aumentar o número de astrócitos, ramificações da microglia e de proteínas simpáticas originando a melhora no desempenho cognitivo.

Tendo em vista os resultados apresentados, esperamos que a utilização do exercício físico como abordagem não farmacológica possa auxiliar a descoberta de mecanismos neuroprotetores, principalmente em indivíduos idosos e, assim prevenir ou amenizar os danos funcionais, e estruturais cerebrais induzidos pela demência, contribuindo para a melhora da qualidade de vida desses indivíduos.

PARTE II

9. INTRODUÇÃO

9.1 Doença arterial periférica: efeitos no músculo esquelético e no cérebro

A doença arterial periférica (DAP) associada a episódios de isquemia-reperusão (IR) do membro inferior é muito frequente e resulta em morbidade e mortalidade significativas. Muitas vezes, é resultante do estreitamento ou oclusão das artérias periféricas que suprem as extremidades inferiores, ou seja, aorta abdominal, ilíaca, femoral, poplítea e artérias tibiais. Dependendo do grau de oclusão é classificada em quatro estágios - DAP assintomática (estágio I); claudicação leve (estágio IIa); claudicação moderada a grave (estágio IIb); dor isquêmica em repouso (estágio III); e ulceração ou gangrena (estágio IV) (164). A DAP pode envolver prognóstico local (amputação de membro) e geral (morte) em um período relativamente curto (164). Assim, a DAP é a terceira principal causa de morbidade vascular aterosclerótica, após doença coronariana e AVE (165). É importante ressaltar que a DAP é um forte indicador de aterosclerose, localizada simultaneamente nas artérias coronárias e cerebrais e levando ao aumento do risco de infarto do miocárdio e cerebral que ocorre em 40-60% dos pacientes com DAP (164, 166, 167).

Recentemente, estudos centraram-se na potencial relação entre a DAP e o cérebro, uma vez que pacientes com DAP frequentemente apresentam disfunção cognitiva. O fato de a DAP estar associada ao prejuízo de processos cognitivos é esperado, uma vez que ambos compartilham fatores de risco cardiovasculares comuns, como hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia, obesidade, estilo de vida sedentário e tabagismo. Esses fatores amplamente distribuídos geralmente favorecem a DAP, alterações cognitivas e desenvolvimentos demenciais (168-171). Portanto, mecanismos específicos que ligam as lesões vasculares periféricas e o cérebro podem desempenhar papéis importantes em doenças crônicas degenerativas. Nessa visão, a inflamação, o estresse oxidativo e as disfunções mitocondrial e vascular são fatores-chave na fisiopatologia da IR e DAP, e estão relacionados ao início e ao desenvolvimento do processo neurodegenerativo (16, 172-176).

Assim, os fatores inflamatórios periféricos liberados durante ou após o processo isquêmico afetam não apenas os membros inferiores (lesão local), mas também têm impacto sistêmico, afetando vários órgãos remotos, como pulmões, coração e rins (177-179), e também o cérebro com impacto na cognição (180-182). Recentemente, confirmando dados

experimentais, ensaios clínicos demonstraram a presença de doença cerebrovascular no contexto da DAP (183).

9.2 Lesão de reperfusão e suas consequências musculares e cerebrais

A lesão de IR é uma condição patológica caracterizada pelo suprimento insuficiente de sangue oxigenado aos tecidos, seguido de reperfusão, que restaura rapidamente o suprimento de oxigênio e substratos. Paradoxalmente, a reperfusão pode exacerbar os efeitos deletérios causados pela isquemia (184).

Durante a isquemia, o suprimento de nutrientes e oxigênio é insuficiente para suprir a demanda energética dos músculos, levando a alterações iônicas e metabólicas. A baixa reserva de ATP é usada predominantemente para manter o potencial de membrana e a compartimentalização de íons, mas devido à privação de oxigênio, a fosforilação oxidativa e a cadeia de transporte de elétrons são inibidas, e o potencial de membrana mitocondrial diminui. Para continuar a produzir ATP, o metabolismo anaeróbico e as vias da fosfocreatina (PCr) são ativadas. A mudança para o metabolismo anaeróbico, o acúmulo de lactato, a formação de EROs, a perda do potencial de membrana mitocondrial e o aumento de Na^+ e Ca^{+2} no citosol, comprometem a integridade celular. Sendo assim, o grau de lesão tecidual é ditado pela magnitude e duração da isquemia. Acredita-se que os danos às células musculares esqueléticas sejam irreversíveis após quatro horas de isquemia (185).

Embora a reperfusão restaure o fornecimento de oxigênio e substratos necessários para o metabolismo aeróbico, a reperfusão em si parece ter consequências prejudiciais. Essa conclusão surgiu há mais de 50 anos, quando se observou que a reperfusão poderia acelerar o desenvolvimento de necrose em corações submetidos à ligadura coronariana (186). O processo de lesão por reperfusão foi denominado para descrever eventos associados à restauração do suprimento sanguíneo, caracterizado pela exacerbação da disfunção celular e aumento da morte celular nos tecidos. Esse evento ocorre por meio de alterações bioquímicas e celulares, levando à produção de radicais livres, interação leucócito-endotélio mediada por citocinas pró-inflamatórias e disfunção mitocondrial (177, 185, 187).

O alto suprimento de oxigênio no início da reperfusão é a principal causa de lesão por reperfusão e morte de miócitos por geração de quantidades excessivas de EROs, participando de processos inflamatórios locais e sistêmicos em células vasculares. Durante a reperfusão,

várias fontes potenciais de produção de EROs são ativadas com a chegada de oxigênio, gerando uma explosão massiva de moléculas reativas, como $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . No início da reperfusão, as mitocôndrias danificadas durante a isquemia não são mais capazes de funcionar eficientemente. O complexo I é invertido após o acúmulo de succinato durante a isquemia, e os complexos mitocondriais I e III são prejudicados e produzem $O_2^{\cdot-}$. Essas modificações são acompanhadas também pelo aumento na concentração de Ca^{+2} no citosol que levam à degradação da membrana celular e a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP), canal localizado na membrana mitocondrial, ocasionando o desacoplamento da fosforilação oxidativa, resultando em mais depleção de ATP, despolarização do potencial de membrana e entrada de água na matriz mitocondrial. Em resumo, a IR dos membros inferiores presente na DAP resulta no suprimento insuficiente de oxigênio devido a redução do fluxo sanguíneo muscular levando à diminuição dos estoques de energia e aumento de EROs, Ca^{+2} , desregulação da dinâmica mitocondrial, abertura do mPTP e, conseqüentemente, a morte celular (185).

Alguns estudos mostram os efeitos deletérios da IR no músculo e da relação entre os efeitos da lesão de IR no cérebro e suas conseqüências na cognição. Chen et al. observaram redução do número de células piramidais na região do hipocampo CA1 e da atividade da superóxido dismutase em ratos, após três horas de isquemia bilateral dos membros inferiores, seguida de 1, 3 e 7 dias de reperfusão. Estas alterações foram acompanhadas por um aumento na apoptose neuronal, produção de EROs e ativação da microglia (181). De acordo com esses resultados, Karimi et al. também demonstraram redução no número de neurônios na região CA1 do hipocampo após duas horas de isquemia bilateral dos membros inferiores em ratos (180). O aumento do número de astrócitos e da caspase-3 também foi evidenciado após isquemia-reperfusão bilateral da artéria femoral em ratos (três horas de isquemia seguida de 1 ou 7 dias de reperfusão). Além disso, os animais apresentaram disfunção cognitiva avaliada pelo experimento do labirinto aquático de Morris (182).

Resultados de Guillot et al. mostraram por oxigrafia de alta resolução uma diminuição na atividade dos complexos I, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial no músculo acompanhada de um aumento na produção de EROs, após três horas de isquemia de clampeamento aórtico seguida por duas horas de reperfusão. No entanto, a lesão do músculo esquelético não foi associada à disfunção mitocondrial precoce nos principais órgãos remotos, como coração, pulmões, fígado, rim e cérebro (188).

Em resumo, esses estudos demonstraram que a IR de membros inferiores pode induzir alterações funcionais e estruturais no cérebro sugerindo uma comunicação entre a periferia e o SNC. No entanto, poucos trabalhos investigaram função mitocondrial cerebral em resposta aos eventos oxidativos e inflamatórios desencadeados na periferia.

9.3 Mitocôndria, fosforilação oxidativa e os complexos mitocondriais

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas de membrana dupla encontradas em células eucariotas que participam de muitas funções fisiológicas, como diferenciação celular, metabolismo energético, sinalização de Ca^{2+} , apoptose, sinalização redox e estresse oxidativo. São organelas de genoma próprio constituídas por duas membranas: a membrana mitocondrial externa (MME) e a membrana mitocondrial interna (MMI), altamente impermeável e seletiva. Entre a MEM e a MIM, existe o espaço intermembranas (EIm) e, limitada pela MIM, há a matriz mitocondrial. A MIM é rica em proteínas e, contém os complexos de I-V que compõem o Sistema Transportador de Elétrons (STE), que se encontram distribuído nas cristas mitocondriais, invaginações da MIM em direção à matriz. A partir da oxidação de substratos, os elétrons são transportados ao longo dos complexos do STE (189).

As mitocôndrias geram energia na forma de ATP via metabolismo oxidativo de substratos energéticos por duas etapas principais 1) oxidação de NADH e FADH, produzidos durante a glicólise, ciclo de Krebs ou β -oxidação e 2) fosforilação oxidativa (190).

A fosforilação oxidativa refere-se ao processo de síntese de ATP acoplada ao consumo de oxigênio pela mitocôndria. Neste processo, há a transferência de elétrons através de grandes complexos de proteínas incorporadas na membrana mitocondrial interna, o que é acompanhado do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV, criando um gradiente eletroquímico de prótons. Este gradiente é, então, utilizado como força protomotriz para a síntese de ATP, que se dá através do retorno de prótons para a matriz mitocondrial. Os complexos respiratórios de I a IV transferem elétrons até seu aceptor final, o oxigênio, que é reduzido a água no complexo IV (189).

O complexo I, ou NADH desidrogenase, ou NADH possui uma parte fixa na MMI, uma face voltada para o EIm e outra voltada para a matriz mitocondrial e é composto por 45 subunidades. Este complexo representa papel central no metabolismo celular sendo o ponto

de entrada dos elétrons na cadeia respiratória. É responsável pela oxidação dos elétrons do NADH em NAD^+ (189, 191, 192).

O complexo II, ou succinato desidrogenase, ou FADH_2 é o único complexo da cadeia respiratória que não bombeia prótons através do MMI. Faz parte do ciclo do ácido cítrico, onde catalisa a oxidação do succinato ao fumarato, acoplado à redução da ubiquinona ao ubiquinol. O ubiquinol é um substrato para o complexo III e, portanto, o complexo II fornece uma segunda ligação direta entre o ciclo do ácido cítrico e a cadeia respiratória, além do NADH que entra na cadeia respiratória no nível do complexo I. O complexo II recebe elétrons do FADH_2 , e apresenta 4 subunidades denominadas SdhA-D. Além disso, o complexo II possui a característica de não realizar o transporte de prótons de H^+ . Acredita-se que o complexo II exista como uma estrutura separada, representando um ponto de interseção entre o ciclo do Krebs e o sistema transportador de elétrons (189, 191).

O complexo III está localizado na MMI com faces para a matriz e para o EIm e é conhecido como um dímero, contendo três subunidades: 1) subunidade do citocromo b; 2) subunidade do citocromo c, contém um grupamento heme tipo c de alto potencial e 3) subunidade do centro de Fe-S de alto potencial. Este complexo mitocondrial é capaz de acoplar a energia de transferência de dois elétrons ao bombeamento de quatro prótons da matriz, mais negativa, para o EIm, mais positivo. Como consequência da transferência desses elétrons, há a redução de moléculas de citocromo c (189).

O citocromo c, encontrada no EIm, é uma proteína que permeia o complexo III e é responsável pela transferência de elétrons entre o complexo III e o complexo IV, também chamado de citocromo c oxidase. Após os elétrons serem reduzidos no complexo III, o citocromo c é oxidado no complexo IV. Este é o último complexo do STE e pertence a uma grande família de oxidases que contém grupos Cobre-Heme (Cu-Heme). Essa transferência de elétrons só é possível devido a uma ligação covalente com um grupo heme. O complexo IV possui duas subunidades com atividade de transferência de elétrons e translocação de prótons para o EIm: 1) a subunidade I possui dois grupamentos heme, sendo eles heme a e heme a₃ e 2) a subunidade II possui um átomo de Cu que forma um centro- Cu_a . O centro- Cu_a é o sítio que serve como aceptor dos elétrons do citocromo c. Logo, os elétrons seguem para o grupamento heme a e por fim, o local que serve como sítio de redução do oxigênio à água. Mecanicamente, a passagem de dois elétrons pelo complexo IV é responsável pela movimentação de quatro prótons da matriz mitocondrial. Dois prótons são utilizados como

substratos para redução de oxigênio à água e outros dois são translocados para o EIm (189, 191).

O complexo V, ou ATP sintase, é um complexo proteico que aproveita a energia armazenada no gradiente de prótons gerado pelos complexos I, III e IV para gerar ATP, transportando um próton do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial. Além dos complexos, o sistema transportador de elétrons conta com 2 fatores difusíveis (citocromo c e a coenzima Q10) que funcionam como carreadores de elétrons dentro do espaço intermembranas mitocondrial entre os complexos respiratórios (189).

Tomado como um todo, após uma sequência de reações de oxi-redução, o ADP é fosforilado à ATP e o oxigênio é consumido. Desta maneira, a mitocôndria é capaz de acoplar a oxidação de substratos através de uma sequência de complexos proteicos que utilizam a energia da transferência dos elétrons até um acceptor final para realizar o bombeamento de prótons contra um gradiente de concentração, criando um potencial eletroquímico que é utilizado por outro complexo proteico para a síntese de ATP, principal molécula energética das células. O processo de síntese de ATP, a fosforilação oxidativa (OxPhos), se dá, portanto, às custas do gradiente eletroquímico de prótons, o qual é mantido pela constante oxidação de substratos. Sendo o consumo de oxigênio na respiração um parâmetro mensurável que reflete a função mitocondrial (193). A Figura a seguir ilustra os complexos mitocondriais.

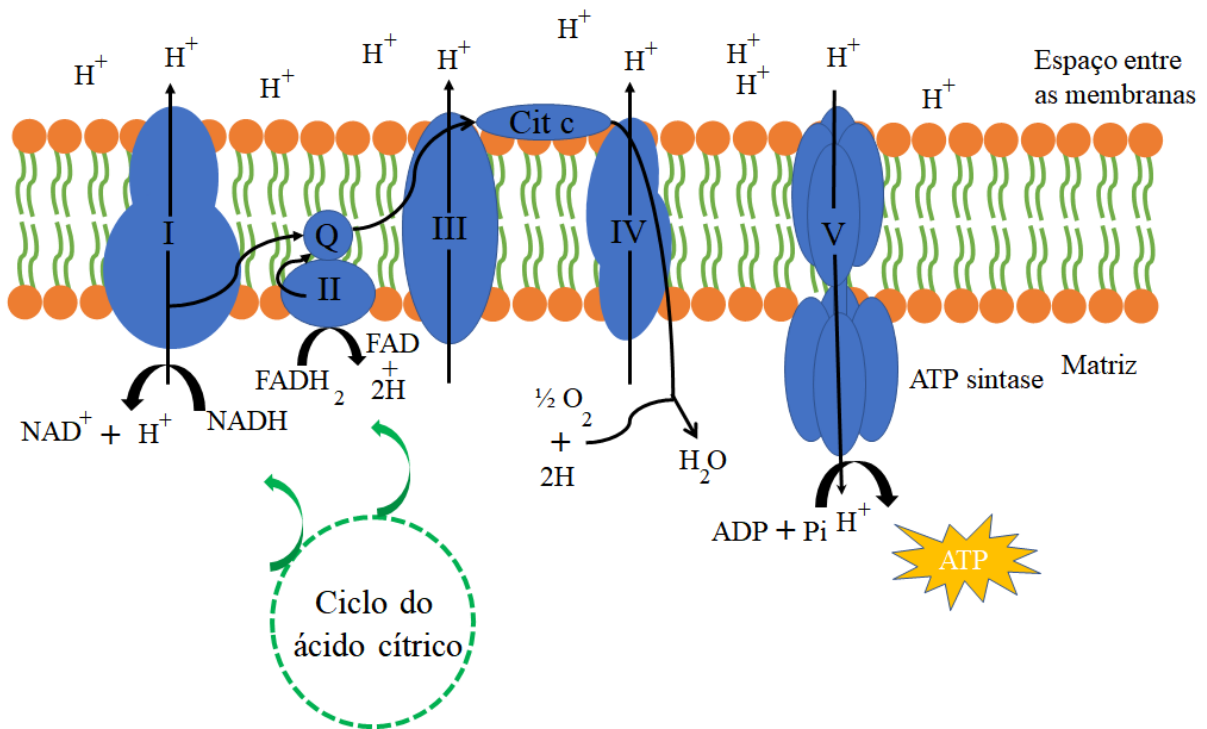


Figura 25: Ilustração dos complexos mitocondriais e da fosforilação oxidativa. Os NADH e FADH₂ carregados de elétrons e H⁺ entregam seus elétrons para um complexo enzimático (I e III, respectivamente). Esses elétrons serão transferidos ao longo desse complexo (I, II, coenzima Q, III, citocromo c e IV), funcionando como transportadores de elétrons e bombas de hidrogênio para o espaço entre as membranas. Este bombeamento de prótons da matriz mitocondrial para o espaço entre as membranas pelos complexos I, III e IV, cria um gradiente eletroquímico de prótons (mais positivo). Este gradiente é, então, utilizado como força protomotriz para a síntese de ATP, que se dá através do retorno de prótons para a matriz mitocondrial (mais negativo), pelo complexo V ou ATP sintase.

9.4 Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo no contexto da neurodegeneração

Como descrito anteriormente, as mitocôndrias têm papel central na produção de energia e em processos de sinalização e, conseqüentemente, na homeostase celular. No entanto, a desregulação da homeostase energética está relacionada com doenças neurodegenerativas e alterações neurológicas. Atualmente, considera-se que, durante o processo de envelhecimento as alterações cerebrais estejam ligadas ao prejuízo funcional das mitocôndrias, como a diminuição da capacidade oxidativa e das defesas antioxidantes, havendo maior geração de EROs e redução da fosforilação oxidativa, logo, diminuição da produção de ATP. A redução na biogênese mitocondrial durante o envelhecimento pode ser devida a alterações nos

processos de fusão e fissão mitocondrial e à inibição da mitofagia, um processo que elimina seletivamente as mitocôndrias disfuncionais (194).

As EROs são uma família de radicais livres gerados a partir da redução parcial do oxigênio, que inclui ânions superóxido ($O^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila e outros não-radicais capazes de gerar radicais livres (195). Embora a geração intracelular de EROs seja um processo inevitável e fisiológico, o acúmulo destas espécies é associado a várias condições fisiopatológicas envolvendo envelhecimento, distúrbios metabólicos e doenças neurodegenerativas (196-198). O desequilíbrio entre a produção de EROs e sua depuração pelos sistemas antioxidantes gera um quadro conhecido como estresse oxidativo, que leva à lesão celular, à disfunção endotelial e à disfunção mitocondrial (199).

O SNC necessita de grande aporte energético para suas funções básicas, como manutenção ou reestabelecimento do potencial de membrana, sinalização e outras funções celulares. As mitocôndrias são responsáveis por aproximadamente 95% do fornecimento de energia para o SNC. O cérebro constitui apenas 2% da massa corporal, mas consome 20% da energia metabólica em repouso produzida por todo o corpo. Os neurônios utilizam de 75% a 80% dessa energia, sendo a maior parte nas sinapses, enquanto o restante é usado pelas células gliais (200). Essa grande demanda energética pelo cérebro é principalmente sustentada pela produção de ATP durante a oxidação da glicose e a fosforilação oxidativa na mitocôndria. Como observado anteriormente, o comprometimento no metabolismo da glicose ou disfunção mitocondrial estão relacionados com processos neurodegenerativos (201). A disfunção mitocondrial no cérebro resulta na desregulação da homeostase de Ca^{+2} e na geração exacerbada de EROs, ambos ligados à neurotoxicidade. Essas alterações acompanhadas pelo processo neuroinflamatório com aumento de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- α , ativam microglias e astrócitos produzindo mais EROs, de modo que a neuroinflamação possa ser causa e consequência do estresse oxidativo em doenças crônicas (202).

As mitocôndrias desempenham papel importante em patologias do SNC, bem como em doenças cardiovasculares e na DAP (185). Logo, o processo de IR presente na DAP é capaz de induzir alterações bioquímicas e morfológicas no músculo esquelético podendo também contribuir para a inflamação e estresse oxidativo em órgãos remotos, como o cérebro.

9.5 Intervenção terapêutica com inibidores da fosfodiesterase

O avanço no conhecimento da fisiopatologia da DAP pode ser útil para abrir novas abordagens terapêuticas. Assim, as disfunções mitocondriais do músculo esquelético, juntamente com o aumento da produção de EROs são fatores-chave. As mitocôndrias desempenham um papel central na homeostase celular, uma vez que são os principais locais de produção de energia através da síntese de ATP. Além da adaptação do metabolismo energético celular, tais organelas também modulam a produção de EROs e, conseqüentemente, a apoptose que é aumentada quando a capacidade de retenção de cálcio nas mitocôndrias é comprometida. Curiosamente, se a isquemia, por si só é claramente lesiva, o período de reperfusão também é responsável por efeitos deletérios que dependem, principalmente, da quantidade de EROs liberada (185).

A utilização de terapias farmacológicas para o tratamento da DAP vem sendo testada. A ciclosporina A, fármaco capaz de proteger o músculo cardíaco após IR, demonstrou proteger o músculo esquelético da inflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial em ratos jovens submetidos à 3 horas de isquemia e 2 horas de reperfusão do membro inferior, no entanto esses efeitos não foram vistos em animais idosos (71-73 semanas de idade) (203, 204). Já a utilização do peptídeo natriurético cerebral, que reduz a extensão do infarto do miocárdio, foi investigada como pré-tratamento em um modelo de IR dos membros inferiores em ratos sendo capaz de reduzir a disfunção mitocondrial do músculo esquelético e o estresse oxidativo (205). Como as principais ações deste peptídeo são mediadas por um aumento no segundo mensageiro intracelular monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), outra abordagem com o objetivo de reduzir a degradação do GMPc pode ser promissora.

Alguns inibidores de fosfodiesterase (PDE) já são usados na prática clínica para o tratamento de disfunção erétil, AVE, artrite, depressão e outras patologias promovendo melhora do fluxo sanguíneo do quadro clínico dos pacientes. A PDE específica de nucleotídeos cíclicos apresenta papel importante nas vias de sinalização normal ou patológica através da degradação dos segundos mensageiros intracelulares, o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e o GMPc, para produzir 5'-AMP e 5'-GMP, respectivamente. Esses segundos mensageiros são importantes reguladores da transdução de sinal intracelular, particularmente aqueles decorrentes da ativação de proteínas receptoras de membrana extracelular, que levam à ativação de adenilil e guanilil ciclases e vias de sinalização intracelular que regulam muitos

processos fisiológicos críticos, incluindo proliferação e morte celular, contratilidade miocárdica, relaxamento do músculo liso vascular e das vias aéreas, reprodução e respostas imunitárias / inflamatórias (206, 207).

Recentemente, resultados demonstraram que as PDEs estão relacionadas com a sobrevivência das células neuronais e, se funcionarem mal, podem estar envolvidas no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a DA, Huntington e esclerose múltipla (208). Como segundos mensageiros, o cAMP ou o cGMP estão envolvidos nos processos cerebrais, incluindo memória, neuroplasticidade e aprendizagem (209-211). As PDEs são expressas em várias regiões do cérebro, como hipocampo, amígdala e cerebelo, assim como no músculo esquelético e liso (207, 212-214).

Poucos trabalhos investigaram os efeitos dos inibidores da PDE no músculo esquelético, no entanto alguns dados sugerem que a modulação das atividades de GMPc e/ou AMPc podem reduzir a disfunção do músculo esquelético. Por conseguinte, a inibição das PDE reduz o estresse oxidativo, que é um fator chave envolvido em muitas doenças agudas e crônicas, caracterizadas por deficiências mitocondriais do músculo esquelético, como na DAP. No trabalho de Hinkle et al., foi demonstrado que inibidores não-seletivos da PDE ou inibidores específicos da PDE do tipo 4 foram capazes de reduzir atrofia muscular após uma manobra de imobilização ou denervação do músculo tibial anterior (215).

A PDE tipo 5 é um membro da superfamília de PDE, que hidrolisa especificamente o GMPc, e é encontrada na musculatura lisa do corpo cavernoso, no músculo esquelético, no músculo liso visceral e vascular, no pâncreas, nos rins e nos pulmões. Inibidores da PDE5, como o sildenafil, têm sido fundamentais para combater a disfunção erétil e a hipertensão pulmonar (216). Além da ação vasodilatadora, o sildenafil também aumenta as concentrações de GMPc no córtex e hipocampo, um efeito que tem sido associado à melhora da função cognitiva em modelos experimentais de AVE e Alzheimer e ao aumento de BDNF, fator responsável pela sobrevivência, maturação e proliferação dos neurônios, desempenhando um papel importante no aprendizado e na memória (217, 218).

A PDE do tipo 4 é outro membro da superfamília PDE e hidrolisa especificamente o AMPc. O rolipram que é um inibidor da PDE4 foi inicialmente concebido como um antidepressivo, e que mais tarde foi utilizado no tratamento do enfisema pulmonar e psoríase (207). O rolipram foi o primeiro composto encontrado a restaurar efetivamente os déficits cognitivos em modelos de Alzheimer, melhorando a função sináptica e cognitiva (219). A

administração crônica de rolipram foi capaz de reverter as alterações induzidas por A β no hipocampo de ratos que receberam injeções intracerebroventriculares de peptídeos A β , o que, por sua vez, induziu déficits de memória (220). A inibição da PDE4 também demonstrou aumento da expressão de BDNF no hipocampo de ratos (221, 222).

Em resumo, a parte II deste trabalho visa avaliar se o pré tratamento com os inibidores da PDE 4 e 5 desempenham um papel importante na fisiopatologia da DAP no músculo esquelético e em órgãos remotos, aqui representado pelo cérebro.

10. HIPÓTESE DE TRABALHO

A isquemia-reperfusão do membro inferior induz disfunção na respiração mitocondrial que poderia afetar órgãos distantes como o cérebro, e o pré-tratamento com os inibidores da fosfodiesterase poderiam reverter/proteger esses fenômenos.

11. OBJETIVOS

11.1 Objetivo geral

Investigar o efeito agudo dos inibidores da fosfodiesterase 4 (rolipram) e 5 (sildenafil) sobre a função mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio no modelo de isquemia-reperfusão do membro inferior em camundongos.

11.2 Objetivos específicos

- Investigar os efeitos da isquemia-reperfusão do membro inferior no músculo esquelético e no hipocampo de camundongos sobre a função mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.
- Investigar o efeito protetor do inibidor da fosfodiesterase 4 no músculo esquelético e no hipocampo de camundongos sobre a função mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.

- Investigar o efeito protetor do inibidor da fosfodiesterase 5 no músculo esquelético e no hipocampo de camundongos sobre a função mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.

12. MATERIAIS E MÉTODOS

12.1 Animais

Foram utilizados 41 camundongos machos Swiss com idade de 12 semanas e peso aproximado de 30g fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório Janvier (França). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), luz (ciclos de 12h claro/escuro) e com comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comité de Ética para experimentação animal em Estrasburgo (*Comité d'éthique en matière d'expérimentation animale de Strasbourg, CREMEAS*).

12.2 Modelo de isquemia-reperfusão do membro inferior e desenho experimental

Primeiramente, todos os animais foram randomizados em 5 grupos experimentais: (1) grupo controle (CTL); (2) grupo controle sem isquemia-reperfusão, mas submetido a anestesia com isoflurano (CTL+ISO); (3) grupo isquemia-reperfusão + solução salina (I/R+NaCl); (4) isquemia-reperfusão + sildenafil (I/R+Sild) e (5) isquemia-reperfusão + rolipram (I/R+Rolip).

Para procedimento de isquemia-reperfusão, os animais foram colocados primeiramente em uma câmara ventilada (MINERVE, Esternay, France) a 4% de isoflurano (Aerrane[®], Baxter Healthcare) e ar atmosférico. Em seguida, os camundongos foram colocados em decúbito dorsal sob uma manta térmica (Equipement Vétérinaire Minerve SA, Esternay, França) com temperatura pré-estabelecida a 35°C e mantida durante todo o procedimento. A anestesia foi mantida através de uma máscara de oxigênio, com concentrações de isoflurano adaptadas às fases cirúrgicas (2-3% isoflurano).

Após verificar a indução da anestesia por meio da perda do reflexo podal, foi iniciada a isquemia utilizando um torniquete acima do trocânter maior do fêmur da pata direita durante 2

horas. O procedimento isquêmico foi caracterizado pelo edema e cianose na pata. Após esse período, os torniquetes foram retirados para iniciar o período de reperfusão de 2 horas (223, 224).

A administração do sildenafil, rolipram ou NaCl foi feita 35 minutos antes da isquemia (1 mg/kg via intraperitoneal) e 5 minutos antes reperfusão (1 mg/kg via intraperitoneal). Os animais do grupo CTL+ISO foram submetidos ao mesmo experimento, ou seja, as 4 horas de anestesia, mas sem o procedimento de IR. O grupo controle não foi submetido nem à IR nem as 4 horas de anestesia.

Ao final do experimento, os animais foram mortos por overdose de anestésico, em seguida, por punção cardíaca, foi coletado o sangue. O músculo gastrocnêmio e o hipocampo foram retirados para as análises da função mitocondrial e produção de EROs.

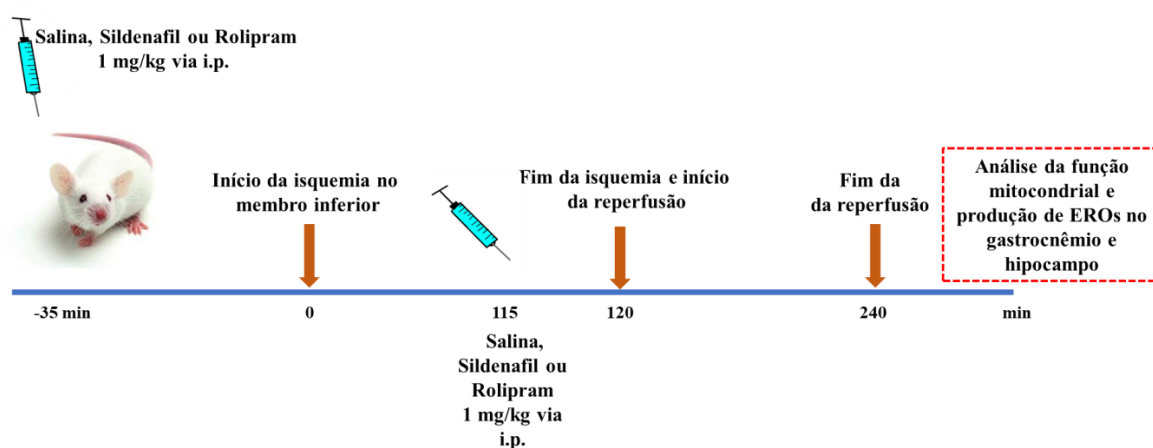


Figura 26: Desenho experimental utilizado para investigar os efeitos dos inibidores da fosfodiesterase no modelo de isquemia-reperfusão do membro inferior em camundongos. Antes do início da isquemia, foi administrado via intraperitoneal Sildenafil ou Rolipram ou salina (1mg/kg). Após 35 minutos após a injeção, os animais foram anestesiados com isoflurano para iniciar a isquemia do membro inferior por 2 horas. A segunda administração de Sildenafil ou Rolipram ou salina foi feita 5 minutos antes do início da reperfusão (115 minutos). Após as 2 horas de isquemia foi iniciada a reperfusão por 2 horas, seguida da coleta do gastrocnêmio e hipocampo para as análises da função mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio e permeabilidade do canal de cálcio. EROs: espécies reativas de oxigênio.

12.3 Estudo da função mitocondrial

12.3.1 Permeabilização das fibras musculares e homogenato cerebral

Após a morte dos animais, os tecidos foram rapidamente retirados e conservados no gelo, em solução de KHB (99 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2mM MgSO₄, 25mM NaHCO₃, 1mM KH₂PO₄, 5.6mM glicose, 20mM HEPES, pH 7.4) até o momento da dissecação.

Sob gelo e com auxílio de uma lupa e duas pinças, o tecido foi dissecado em solução de tampão Krebs-Henseleit (KHB). Delicadamente, as fibras foram separadas da gordura e do tecido conjuntivo, pesadas e então, permeabilizadas com 1,5 ml de solução S (2,77 mM de CaK₂EGTA ; 7,23 mM de K₂EGTA; 6,5 mM de MgCl₂; 6mM Na₂ATP; 12.3 mM fosfocreatina; 20 mM de imidazol ; 20 mM de taurina ; 0,5 mM de ditioneitol ; 50mM K metanossulfonato pH 7.4) acrescida de saponina (50 µg/ml) por 30 minutos à 4°C, em agitação. Em seguida, as fibras foram lavadas em um banho de 10 minutos e por fim, antes de iniciar as análises o tecido era lavado em 2 banhos de 5 minutos em meio de respiração mitocondrial Mir05 (0,5 mM de EGTA; 3 mM de MgCl₂; 60 mM de K lactobionate; 20 mM de taurina; 10 mM de KH₂PO₄; 20 mM de HEPES; 110 mM de sacarose; 20mM creatina e 1g/L de BSA, pH 7.1) acrescida de creatina à 4°C em agitação a fim de remover a saponina e quaisquer outros fosfatos (225).

O homogenato do hipocampo foi utilizado para as análises da função mitocondrial e da produção de EROs. Com auxílio de um bisturi, o cérebro foi dividido em 2 hemisférios, e em seguida, utilizando duas pinças e uma espátula (nº 70) o hipocampo foi dissecado e reservado uma parte para a respiração mitocondrial (hemisfério direito) e outra parte para a análise da produção de EROs (hemisfério esquerdo). Logo após, o tecido foi pesado (o excesso de líquido foi retirado com um papel absorvente) e homogeneizado manualmente com um pilão de polipropileno em um tubo do tipo Eppendorf com solução KHB ou Mir05 na proporção de 1mg de hipocampo/10µl de KHB (para a análise por RPE) ou Mir05 (para a análise da respiração mitocondrial). Todo o procedimento foi realizado em gelo (226).

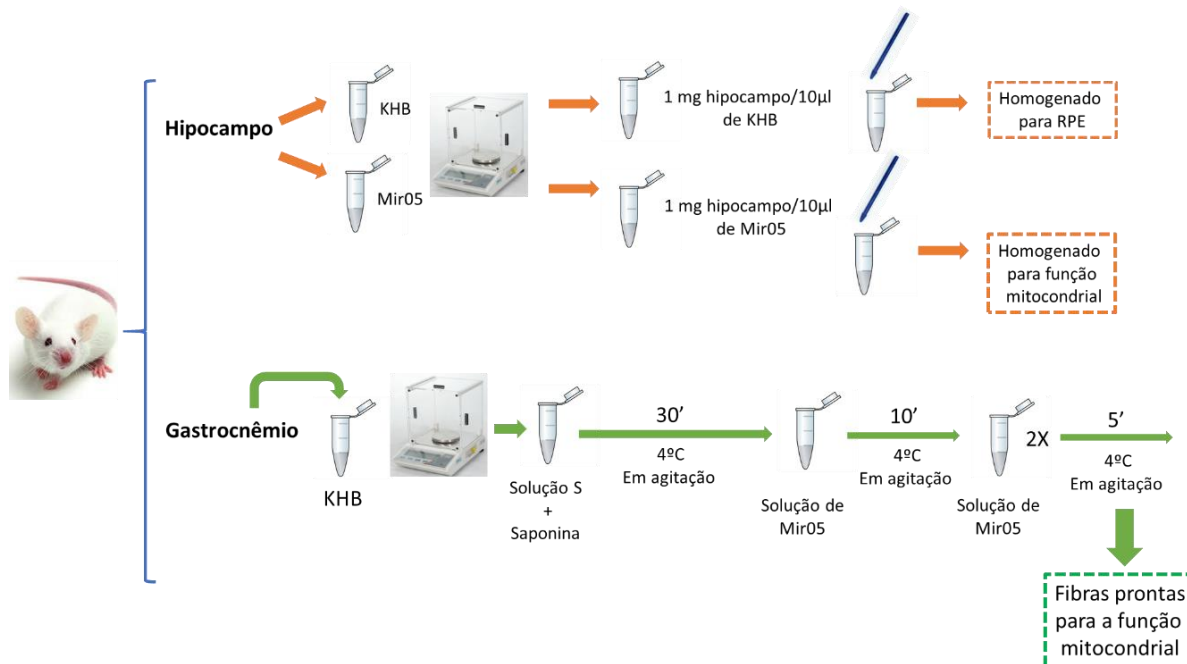


Figura 27: Imagem representativa do protocolo de preparação para a função mitocondrial do músculo esquelético e do hipocampo. KHB: tampão de Krebs-Henseleit; Mir05: meio de respiração mitocondrial Mir05.

12.3.2 Estudo da função de complexos da cadeia respiratória mitocondrial muscular e cerebral e acoplamento mitocondrial

A medida do consumo de oxigênio de um tecido é uma técnica específica para determinar a capacidade oxidativa em seu ambiente celular. A respiração mitocondrial foi medida com respirometria de alta resolução Oroboros Oxygraph-2 k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) usando um eletrodo tipo Clark a 37 °C em 2 ml de tampão de respiração Mir05. O sistema Oroboros Oxygraph-2 k permite a medição simultânea de duas amostras mitocondriais diferentes (cada uma em uma cuba), gerando gráficos da concentração de oxigênio e do consumo de oxigênio em cada cuba, ou seja, referente a cada amostra. A respiração é expressa em micromoles de oxigênio consumido por minuto sobre o peso da amostra de músculo (mmol/min/g) ou em pmol/(s*mL) de homogenato cerebral.

A contribuição relativa dos complexos de cadeia respiratória I, II, III e IV para a taxa respiratória mitocondrial global pode ser estudada utilizando diferentes substratos. O ensaio da respiração começa com limpeza das cubas (2 banhos de H₂O, 2 banhos de etanol 100%, 3 banhos de etanol 70% e 3 banhos de H₂O), em seguida é adicionado 2 ml do tampão Mir05

em cada cuba e depois as cubas são fechadas deixando um espaço para que o oxigênio entre e então, é iniciada a calibração por pelo menos 1h e meia.

Em cada cuba eram colocadas as fibras musculares (em torno de 8-10 mg) ou o homogenato cerebral (20 μ l) e os substratos. Para as fibras musculares foram utilizados os substratos glutamato (5mM) e malato (2mM) e para o homogenato cerebral os mesmos, com adição de piruvato (5mM). O platô gerado no gráfico do consumo de oxigênio após 10 minutos era considerado a respiração basal (V_0). Depois, foi adicionado adenosina difosfato (ADP) gerando a respiração máxima (V_{max}). Posteriormente, o complexo I foi bloqueado com a rotenona (0,02 mM - V_{rot}), e o complexo II foi estimulado com succinato (25 mM). A respiração mitocondrial nestas condições permite a investigação de atividades dos complexos II, III e IV (V_{succ}). Por fim, foi adicionado o doador de elétrons artificial ao complexo IV, o dihidroclorato de N, N, N'-tetrametil-p-fenilenodiamina (TMPD-0,5 mM) e ascorbato (0,5 mM). A atividade do complexo IV foi determinada como um passo isolado da cadeia respiratória ($V_{tmpd/asc}$). Os substratos eram injetados nas cubas com seringas Hamilton (203, 226-228).

Ao final do experimento as fibras musculares que estavam dentro da cuba eram recuperadas para mensurar o peso seco.

12.4 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio por espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (RPE)

A ressonância paramagnética eletrônica também conhecida como ressonância de spin eletrônico é um dos poucos métodos que permitem a detecção direta de elétrons desemparelhados, ou seja, radicais livres em células e amostras de tecido. Aqui, foi possível investigar a formação de superóxido (229, 230).

O espectrômetro de RPE consiste em um gerador de micro-ondas e uma cavidade ressonante cercada por um par de ímãs elétricos (Figura 28). As micro-ondas são liberadas do gerador à cavidade do ressonador e, quando o espectrômetro é sintonizado, toda a energia fornecida ao ressonador é absorvida, de modo que nenhuma energia de micro-ondas é refletida de volta da cavidade do ressonador. Quando um campo magnético é aplicado à amostra, os elétrons paramagnéticos desemparelhados atuam como pequenas bússolas que se orientam em uma direção paralela ou antiparalela ao campo magnético, criando 2 níveis de

energia distintos para os elétrons não-pareados, de tal forma que a absorção da energia de micro-ondas provoca uma transição do estado inferior para o estado mais alto. Essa transição ocorre quando o campo magnético (B_0) causa uma diferença entre os 2 estados de energia do elétron igual à energia de micro-ondas ($h\nu = g \times \mu_B \times B$), onde “ $h\nu$ ” é a energia de micro-ondas, “ g ” é o fator constante igual a 2.002 para a maioria das amostras orgânicas, e “ μ_B ” é a constante de magneton de Bohr.

A aplicação da técnica de RPE consiste em provocar uma transição entre esses estados através da excitação da amostra com um feixe de fótons com energia igual a diferença entre os dois níveis, assim aplica-se um campo magnético externo B_0 para provocar essa transição.

O campo magnético, B_0 , produz dois níveis de energia para o momento magnético (resumindo, seria o torque do elétron). O elétron não emparelhado terá um estado de menor energia quando o momento do elétron é alinhado com o campo magnético e uma fase de alta energia quando está alinhada contra o campo magnético.

A RPE detecta a absorção de energia de micro-ondas, que ocorre na transição de elétrons desemparelhados em um campo magnético aplicado. A amplitude do sinal da RPE é proporcional ao número de elétrons não pareados presentes na amostra, permitindo a quantificação de radicais livres.

A maioria dos radicais biologicamente relevantes é muito curta e, portanto, impossível de ser detectada em amostras biológicas. Por esta razão, foi utilizado o clilil-hidroxilamina, 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina (CMH), formando adutos estáveis com os radicais.

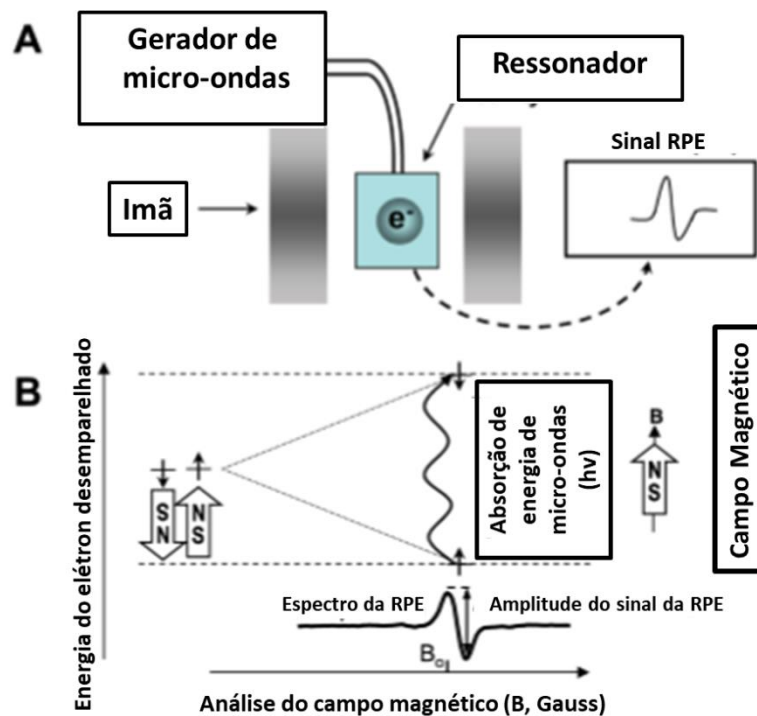


Figura 28: Funcionamento da ressonância paramagnética eletrônica - RPE. Em A, o gerador de micro-ondas, um ressonador e ímãs. A RPE detecta a absorção de energia de micro-ondas na transição de elétrons desemparelhados em um campo magnético aplicado (B). Como o elétron tem um momento magnético, ele age como uma bússola quando é colocado em um campo magnético (B). O momento do elétron terá um estado de energia mais baixa estiver alinhado com o campo magnético (↑) e um estado de energia mais alta quando alinhado contra o campo magnético (↓). A energia do elétron desemparelhado, portanto, é uma função do campo magnético: $E = \pm 0,5g \mu_B B$, onde “g” é a constante do fator g, “ μ_B ” é a constante de magneton de Bohr e “B” é a campo magnético (adaptado de Dikalov *et al.* 2007) (230).

12.4.1 O ensaio de produção de EROs pela RPE

As fibras do músculo gastrocnêmio (1 mm^3 de tamanho) ou o homogenato do hipocampo foram incubadas por 30 minutos com Buffer RPE (KHB, dietilditiocarbamato e deferoxamina) e CMH5 em uma incubadora termorregulada à 37° , sob pressão controlada (20 mmHg) e mistura gasosa (N_2 :97,8% e O_2 : 2,8%) para mimetizar o ambiente tecidual (Noxygen, Alemanha). Em seguida a placa foi deixada por 10 minutos no gelo e por fim $40 \mu\text{l}$ de cada amostra foi recuperada da placa e colocada em um capilar para iniciar a medição pelo aparelho de RPE (Bruker Win-EPR[®], Bruker Analytik, GmbH). A análise foi feita por meio do *software* do mesmo aparelho (176, 204).

12.5 Análise estatística

Os dados dos cinco grupos foram comparados utilizando ANOVA (two way) e pós-teste de Bonferroni ou test-t de Student, quando necessário, por meio do software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, Califórnia). Os resultados com um valor de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

13. RESULTADOS

13.1 Resultados no músculo esquelético

13.1.1 Os inibidores da fosfodiesterase não protegeram o músculo esquelético da disfunção mitocondrial após a isquemia-reperfusão

A cadeia respiratória mitocondrial envolve quatro complexos que produzem energia por transferência de elétrons e consumo de oxigênio. Utilizando a técnica de respirometria, foi possível investigar esses complexos mitocondriais. Resumidamente, o protocolo utilizado neste trabalho permitiu o estudo dos complexos I (Figura 29 – A e B), complexo II (Figura 29 – C) e complexo IV (Figura 29 – D). A análise dos complexos mitocondriais no músculo esquelético após a IR do membro inferior demonstrou redução da respiração mitocondrial no gastrocnêmio da pata isquemiada (I) quando comparada com o gastrocnêmio da pata contralateral (CL) e também quando comparamos a pata CTL do grupo controle submetido à 4 horas de anestesia com isoflurano com o grupo controle sem anestesia com isoflurano (CTL: $10,63 \pm 14,47$; CTL+Iso: $5,69 \pm 1,0$ pmol/(s*mg peso úmido)).

Quando investigamos os efeitos dos inibidores da fosfodiesterase, verificamos uma redução do $V_{m\acute{a}x}$ entre o gastrocnêmio da pata contralateral e o da pata isquemiada foi observada nos grupos tratados com sildenafil (CL-I/R+Sild: $31,64 \pm 4,64$ vs. I-I/R+Sild: $5,5 \pm 1,36$ pmol/(s*mg peso úmido); $p < 0,001$) e rolipram (CL-I/R+Rolip: $28,8 \pm 5,31$ vs. $6,12 \pm 1,25$ pmol/(s*mg peso úmido); $p < 0,01$). O V_{succ} , demonstrou que o tratamento com o sildenafil reduziu a atividade do complexo II entre o gastrocnêmio da pata contralateral e o da pata isquemiada (CL-I/R+Sild: $50,46 \pm 6,6$ vs. I-I/R+Sild: $29,73 \pm 4,33$ pmol/(s*mg peso úmido); $p < 0,05$). E em relação à análise do complexo IV não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

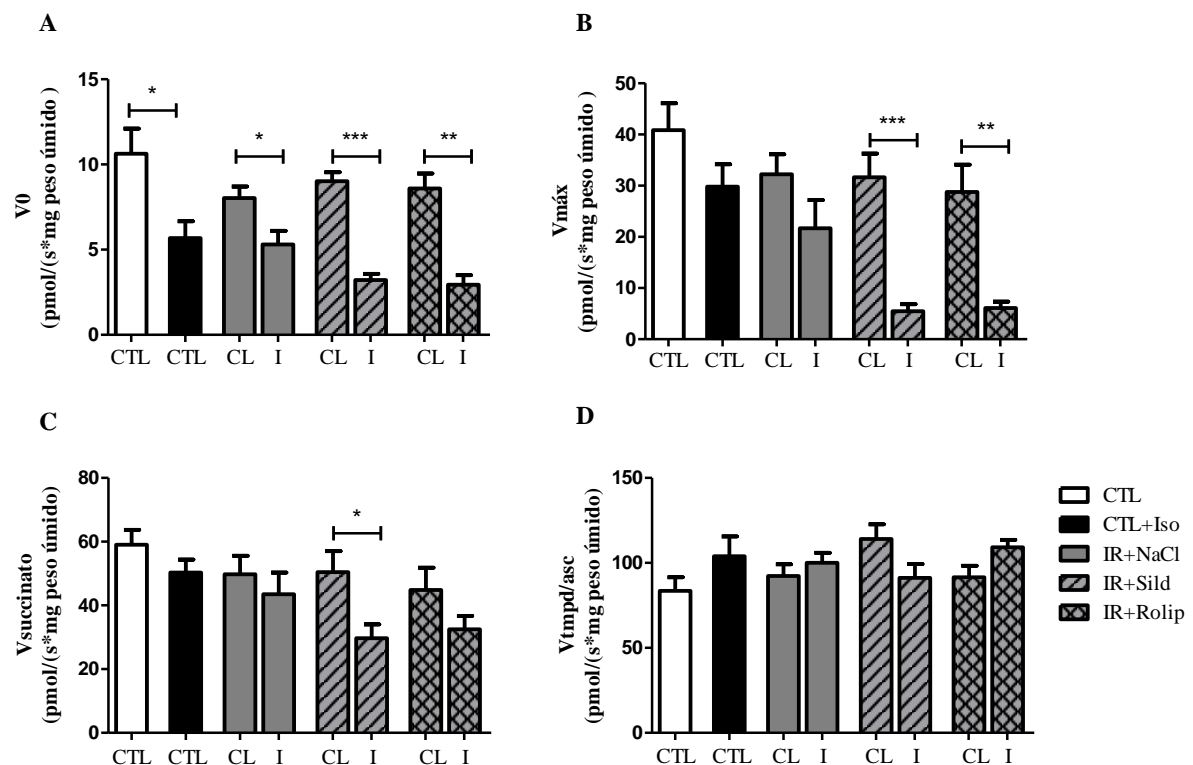


Figura 29: Respiração mitocondrial do gastrocnêmio de camundongos após isquemia-reperfusão do membro inferior. Em A, V_0 representa a capacidade oxidativa basal; em B, o $V_{máx}$ representa a capacidade oxidativa máxima; em C, o V_{succ} representa a atividade do complexo II; em D, $V_{tmpd/asc}$ representa a atividade do complexo IV. CL: gastrocnêmio contralateral; I: gastrocnêmio isquemiado. CTL: grupo controle sem isquemia-reperfusão e sem 4 horas de anestesia com isoflurano; CTL+ISO: grupo controle sem isquemia-reperfusão, mas submetido a 4 horas de anestesia com isoflurano; I/R+NaCl: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com salina; I/R+Sild: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com sildenafil e I/R+Rolip: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com rolipram. CL: pata contralateral e I: pata submetida à isquemia-reperfusão. Análise estatística entre os grupos CTL vs. CTL+ISO: test-t de Student não pareado; entre a pata CL e pata I do mesmo grupo experimental: test-t de Student pareado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

13.1.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético por RPE

A análise da produção de superóxido foi feita pela técnica de RPE, na qual observamos que a isquemia por 2 horas, seguida de reperfusão durante 2 horas no membro inferior não foi capaz de aumentar a produção de EROs quando comparada com a pata contralateral (CL: $0,09 \pm 0,01$ vs. I: $0,10 \pm 0,01$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ peso seco; $p > 0,05$). O tratamento com o sildenafil

(CL: $0,09 \pm 0,01$ vs. I: $0,12 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ peso seco; $p>0,05$) ou rolipram (CL: $0,10 \pm 0,12 \pm 0,02$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ peso seco; $p>0,05$) não alterou este parâmetro.

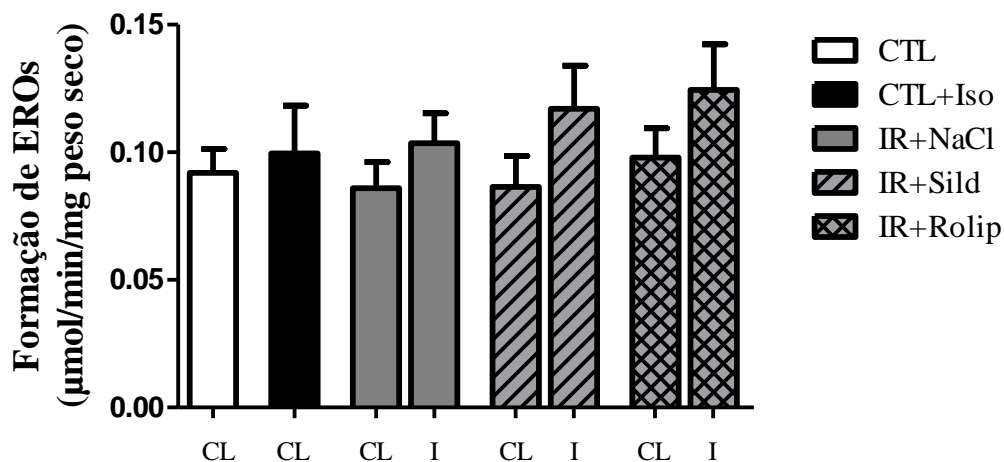


Figura 30: Gráfico representativo da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por RPE no gastrocnêmio. CL: gastrocnêmio contralateral; I: gastrocnêmio isquemiado. CTL: grupo controle sem isquemia-reperfusão e sem 4 horas de anestesia com isoflurano; CTL+ISO: grupo controle sem isquemia-reperfusão, mas submetido a 4 horas de anestesia com isoflurano; I/R+NaCl: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com salina; I/R+Sild: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com sildenafil e I/R+Rolip: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com rolipram. EROs: espécies reativas de oxigênio; CL: pata contralateral e I: pata submetida à isquemia-reperfusão. $p>0,05$ CL vs. I (test-t de Student pareado).

13.2 Resultados no hipocampo

13.2.1 A isquemia-reperfusão do membro inferior não alterou a função mitocondrial no hipocampo

Para estudar a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial, medimos o consumo de oxigênio no homogenato do hipocampo. Sendo assim, nesta segunda etapa da tese investigamos os efeitos da IR do membro inferior e dos inibidores da fosfodiesterase no hipocampo em relação aos complexos da cadeia transportadora de elétrons. De início, não encontramos diferença estatística na respiração basal (V_0) entre os grupos (CTL: $16 \pm 1,13$; CTL+Iso: $16,8 \pm 0,6$; I/R+NaCl: $15,6 \pm 2,1$; I/R+Sild: $17 \pm 1,13$ e I/R+Rolip: $15,4 \pm 0,96$

pmol/(s*ml); $p>0,05$). No entanto, o sildenafil apresentou aumento na respiração máxima ($V_{\text{máx}}$) quando comparado com o grupo salina (I/R+NaCl: $36,7 \pm 5,4$ vs. I/R+Sild: $52 \pm 4,7$ $p<0,05$). Quando analisamos a atividade dos complexos II, III e IV (V_{succ}) observamos aumento entre o grupo tratado com sildenafil e o grupo salina (I/R+NaCl: $49,56 \pm 4,0$ vs. I/R+Sild: $59,6 \pm 3,0$ $p=0,06$). Por fim, não houve diferença entre os grupos em relação à atividade do complexo IV ($V_{\text{tmpd/asc}}$) (CTL: $97 \pm 7,73$; CTL+Isso: $82,4 \pm 7,86$; I/R+NaCl: $104,6 \pm 11,5$; I/R+Sild: $102 \pm 4,65$; I/R+Rolip: $107 \pm 6,9$ pmol/(s*ml); $p>0,05$).

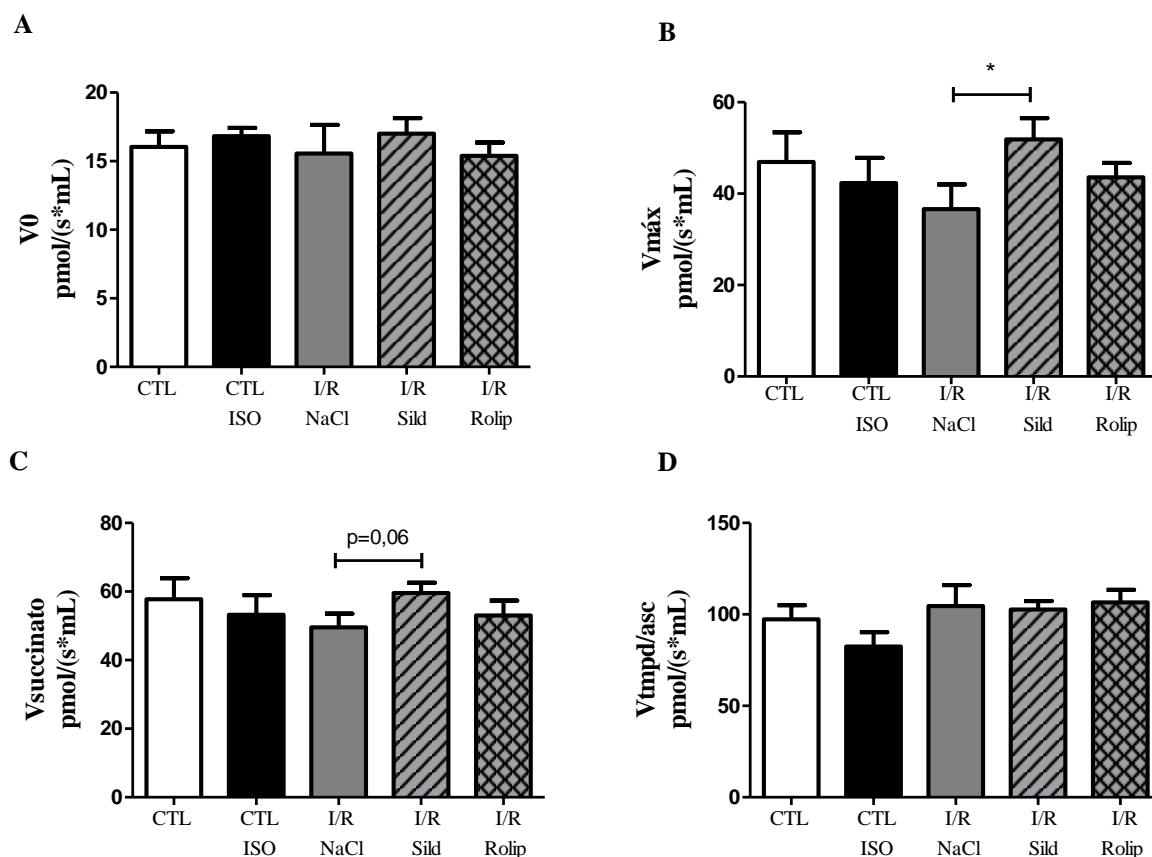


Figura 31: Respiração mitocondrial do hipocampo de camundongos após isquemia-reperfusão do membro inferior. Os valores representam a média \pm E.P.M (n = 6-8 animais por grupo). Em A, V_0 representa a capacidade oxidativa basal; em B, o $V_{m\acute{a}x}$ representa a capacidade oxidativa máxima; em C, o V_{succ} representa a atividade do complexo II; em D, $V_{tmpd/asc}$ representa a atividade do complexo IV. CTL: grupo controle sem isquemia-reperfusão e sem 4 horas de anestesia com isoflurano; CTL+ISO: grupo controle sem isquemia-reperfusão, mas submetido a 4 horas de anestesia com isoflurano; I/R+NaCl: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com salina; I/R+Sild: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com sildenafil e I/R+Rolip: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com rolipram. Em B, $*p < 0,05$ vs. I/R NaCl (pelo test-t de Student não pareado) e em C, $p = 0,06$ vs. I/R NaCl (pelo test-t de Student não pareado).

13.2.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio no hipocampo por RPE

Os efeitos da IR do membro inferior e dos inibidores da fosfodiesterase no hipocampo em relação a produção de EROs, demonstraram que a IR do membro inferior não foi capaz de aumentar a produção de EROs no hipocampo, no entanto observamos aumento no grupo tratado com o rolipram quando comparado com os grupos salina ($p < 0,05$) e sildenafil ($p < 0,01$) (CTL: $395,24 \pm 83,36$; CTL+Iso: $430,41 \pm 37,65$; I/R+NaCl: $351,85 \pm 424,34$; I/R+Sild: $345,5 \pm 31,41$ e I/R+Rolip: $481,69 \pm 10,46$ unidades arbitrárias).

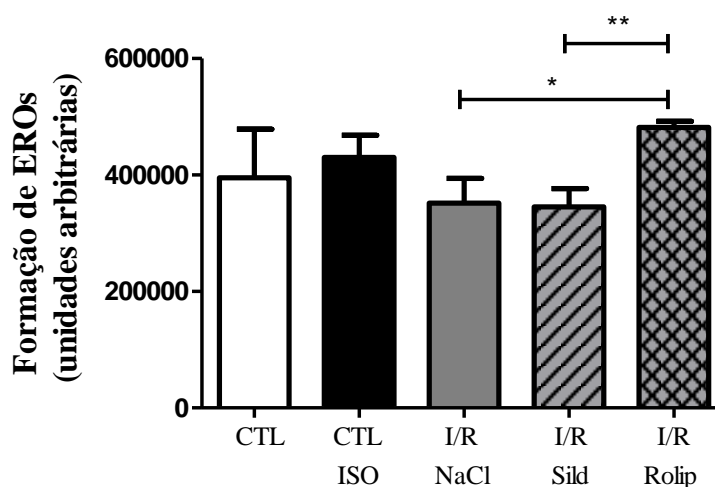


Figura 32: Gráfico representativo da produção de espécies reativas de oxigênio por RPE no hipocampo. Os valores representam a média \pm E.P.M (n = 6-8 animais por grupo). CTL: grupo controle sem isquemia-reperfusão e sem 4 horas de anestesia com isoflurano; CTL+ISO: grupo controle sem isquemia-reperfusão, mas submetido a 4 horas de anestesia com isoflurano; I/R+NaCl: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com salina; I/R+Sild: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com sildenafil e I/R+Rolip: grupo submetido à isquemia-reperfusão e tratado com rolipram. * $p < 0,05$ vs. I/R NaCl (pelo test-t de Student não pareado) e ** $p < 0,01$ vs. I/R NaCl (pelo test-t de Student não pareado).

14. DISCUSSÃO

A investigação da respiração mitocondrial e da produção de EROs após 2 horas de isquemia e 2 horas de reperfusão no membro inferior de camundongos, não demonstrou redução na função mitocondrial máxima do hipocampo. No entanto, quando comparamos o músculo gastrocnêmio da pata contralateral com a isquêmica observamos redução na respiração mitocondrial. O tratamento com o sildenafil antes da isquemia e poucos minutos antes da reperfusão aumentou a respiração máxima e a atividade do complexo II no hipocampo. Porém, os tratamentos com o sildenafil ou rolipram não foram capazes de proteger a disfunção mitocondrial no músculo esquelético ou na produção de espécies reativas no hipocampo e no gastrocnêmio.

O músculo gastrocnêmio foi escolhido em virtude de sua suscetibilidade a lesões por IR em animais e humanos, permitindo que ele seja um alvo-chave na investigação de novas abordagens terapêuticas (231). Os resultados desta tese corroboram os trabalhos anteriores que também demonstraram redução na respiração mitocondrial no músculo esquelético após IR do membro inferior. No estudo conduzido por Lejay et al., os autores encontraram redução na função mitocondrial 30 dias após a oclusão da artéria femoral e ilíaca comum direita e que o exercício físico aeróbio foi capaz de restaurar a função mitocondrial, mas não a produção de EROs (176). A isquemia por 3 horas seguida de reperfusão por 2 horas também foi capaz de reduzir a respiração mitocondrial no músculo grácil em ratos, sendo a resposta mais exacerbada em ratos com diabetes do tipo I. Esses resultados foram acompanhados por aumento na produção de EROs, capase-3 e redução nos níveis de enzimas anti-oxidantes (232). Utilizando o mesmo modelo de IR apresentado no presente trabalho, Tetsi et al. encontraram disfunção mitocondrial muscular, redução da capacidade de retenção de cálcio - um marcador de apoptose - e tendência no aumento de espécies reativas de oxigênio (233). Em conjunto, esses resultados sugerem que a IR é capaz de gerar danos mitocondriais no músculo esquelético.

Os efeitos da isquemia-reperfusão no membro inferior não ficam restritos ao músculo esquelético. Estudos anteriores demonstraram que fígado, pulmão e rins apresentaram danos funcionais e/ou estruturais após a IR dos membros inferiores (177, 224, 234) e mais recentemente o cérebro vem sendo investigado como mais um órgão remoto suscetível aos danos decorrentes da IR dos membros inferiores. Danos estruturais, bioquímicos,

inflamatórios e comportamentais foram descritos no cérebro após a IR de membros inferiores (180, 181, 235). Confirmando esses achados, embora não tenhamos encontrado diferença estatística, a redução de 22% no $V_{m\acute{a}x}$ (grupo I/R NaCl vs. CTL) sugere danos na respiração mitocondrial do hipocampo. Uma possível razão para não observarmos de forma evidente a disfunção mitocondrial no hipocampo seria o pouco tempo de reperfusão utilizado neste trabalho. No estudo de Karimi et al., os autores sugeriram que a isquemia por 2 horas no membro inferior comparada à isquemia renal de 45 minutos induziu efeitos distantes mais prejudiciais no hipocampo como perda neuronal e redução da plasticidade sináptica após 1 dia de reperfusão. Além disso, a I/R renal combinada com de membro inferior não adicionou ou potenciou esses efeitos (180). Utilizando a isquemia bilateral dos membros inferiores, Chen et al. encontraram ativação da microglia, apoptose neuronal e disfunção cognitiva após 1, 3 e 7 dias de reperfusão em ratos (181). Guillot et al. sugeriram que o estresse oxidativo precede a disfunção mitocondrial, sendo assim, sugerimos que a lesão de reperfusão em mitocôndrias do hipocampo seriam mais evidentes com um tempo maior de reperfusão (188).

Estudos relataram anteriormente um efeito protetor dos inibidores da fosfodiesterase em modelos de IR. Assim, a proteção a curto e longo prazo do inibidor do tipo 4 e 5 foi relatada durante a IR no miocárdio (236-238) e no fígado (239, 240), sugerindo redução do estresse oxidativo, inflamação, melhora da integridade mitocondrial e função endotelial. No presente trabalho, tanto o tratamento com o sildenafil ou rolipram não foram capazes de proteger o músculo esquelético da IR. Resultados similares foram encontrados por Tetsi et al. no qual camundongos pré-tratados com sildenafil (1 mg/kg via intraperitoneal) 30 minutos antes da isquemia do membro inferior, não apresentaram proteção no músculo esquelético em relação à função mitocondrial e produção de EROs (233). No entanto, os resultados de outro trabalho demonstraram que a administração de sildenafil ao final da isquemia era capaz de reduzir caspase-3, marcador de apoptose celular, no músculo solear de ratos (241).

O rolipram foi o primeiro composto descrito como um inibidor específico do PDE4. Sua estrutura química levou à pesquisa e desenvolvimento de inibidores específicos de PDE4 apresentando um efeito anti-inflamatório. Neste trabalho, curiosamente, observamos que o tratamento com o rolipram não gerou redução na detecção de EROs e nem protegeu as mitocôndrias do gastrocnêmio após a IR do membro inferior. Embora tenha sido demonstrado que a PDE4 pode ser a principal forma da PDE (75%) no músculo esquelético de humanos (242), até o presente momento não foram encontrados relatos na literatura sobre os efeitos do

rolipram no músculo esquelético em modelos de IR do membro inferior. No entanto, o uso dos inibidores da PDE4 em outras patologias demonstrou efeitos positivos, como no modelo experimental da distrofia muscular de Duchenne, doença que leva à insuficiência cardíaca ou respiratória relacionada à perda muscular progressiva. Nio et al. observaram que a administração diária de 30mg/kg (via oral) por 8 semanas de piclamilast, inibidor da PDE4, reduziu os níveis de RNAm pró-fibrótico e inflamatórios no gastrocnêmio. A terapia combinada com sildenafil (mesma dose e tempo) foi capaz de potencializar o efeito anti-fibrótico e reduzir os níveis plasmáticos de creatina quinase, um conhecido marcador de dano muscular, via aumento de PGC1- α no gastrocnêmio (243). Já a administração intratraqueal do inibidor da PDE4 em um modelo de inflamação pulmonar, foi capaz de reduzir citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6, no pulmão (244).

Até o momento não existem estudos que investigaram os efeitos dos inibidores da PDE no cérebro após a IR do membro inferior. Neste trabalho, observamos que a administração de inibidores da PDE foi capaz de aumentar a produção de EROs no hipocampo, apresentando efeito contrário do encontrado no músculo esquelético. No entanto, apenas o aumento de EROs não caracteriza o quadro de estresse oxidativo, sendo então necessário o estudo das enzimas antioxidantes para melhor compreensão. Porém, alguns achados mostram efeitos protetores dos inibidores da PDE em modelos de demência. No que se referem aos efeitos dos inibidores da PDE5 neste trabalho, os nossos resultados sugerem que o sildenafil foi capaz de melhorar a respiração mitocondrial. Trabalhos anteriores também demonstraram efeitos benéficos do sildenafil no SNC, onde o tratamento com 15 mg/kg (via intraperitoneal) por 5 dias, foi capaz de induzir a expressão de genes associados a memória no hipocampo. Ainda, o tratamento a curto prazo, por 5 semanas, restaurou a função cognitiva, reduziu a fosforilação da proteína tau e aumentou os níveis de BDNF no hipocampo de camundongos com a DA (244). O pré-tratamento durante 2 semanas de sildenafil (25 mg/kg, via oral) foi capaz de induzir neuroproteção e reduzir o estresse oxidativo e ansiedade em camundongos expostos ao estresse por ruído (245).

Embora não tenhamos encontrado efeito com o tratamento do rolipram, outros resultados da literatura sugerem que o tratamento por 21 dias (0,1-0,3 mg/kg via intraperitoneal) com o rolipram gerou efeito antidepressivo e ansiolítico em camundongos após o AVE, além disso foi capaz de melhorar a memória espacial, via aumento de marcadores sinápticos (246). O inibidor da PDE4 administrado durante 14 dias (via

intraperitoneal) também demonstrou efeitos restauradores na memória assim como redução no estresse oxidativo e infiltrado de neutrófilos no cérebro de animais com DA. O tratamento sub-crônico por 5 dias com o rolipram apresentou melhora na memória de longo prazo em ratos (247). Em conjunto, podemos sugerir que os efeitos dos inibidores da PDE 4 e 5 no cérebro são geralmente mais eficazes em tratamentos crônicos.

15. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados neste estudo, podemos concluir que:

- A curto prazo a isquemia-reperfusão induz danos expressivos no músculo esquelético, mas não no hipocampo;
- A isquemia-reperfusão no membro inferior reduziu a atividade dos complexos I e II no músculo esquelético, mas sem aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio;
- Ambos os tratamentos com os inibidores não protegeram o músculo esquelético da disfunção mitocondrial após a isquemia-reperfusão do membro inferior;
- Embora não tenhamos encontrado redução na atividade dos complexos mitocondriais no hipocampo, o tratamento agudo com sildenafil aumentou a atividade do complexo I e II.

Os nossos resultados em conjunto com o que está disponível na literatura, nos permitem sugerir que diferente do músculo esquelético, os efeitos cerebrais decorrentes de um evento isquêmico na periferia, como a isquemia-reperfusão do membro inferior, estariam mais pronunciados na fase crônica. Nesta fase, o estresse oxidativo e a inflamação desencadeariam alterações, como a redução no número de neurônios, impactando a função cognitiva.

Em relação ao tratamento agudo com os inibidores da PDE 4 e 5 após a isquemia-reperfusão do membro inferior, necessitam de mais estudos para que possamos sugerir a sua utilização ou não nesses casos. No entanto, seus efeitos no hipocampo indicaram o aumento

na atividade de alguns complexos mitocondriais, corroborando os resultados de outros estudos, que observaram melhora em parâmetros funcionais, como a memória, quando administrado de forma crônica. Portanto, é necessário o estudo de outros parâmetros inflamatórios e circulatórios neste modelo de doença arterial periférica, assim como os efeitos do tratamento a curto e longo prazo com os inibidores da fosfodiesterase em diferentes órgãos.

16. CONCLUSÃO GERAL

A curiosidade em entender o cérebro e suas funções no estado saudável e patológico, levam a busca de novos mecanismos, tratamentos e técnicas que permitam desvendar o funcionamento deste órgão. Como discutido anteriormente, o comprometimento das funções cerebrais sejam eles desencadeados por danos locais, como a hipoperfusão cerebral crônica ou por danos periféricos, como na doença arterial periférica vem sendo destaque em publicações, haja vista o aumento da expectativa de vida e o impacto socioeconômico gerado pelas comorbidades decorrentes de processos neurodegenerativos. Sendo assim, este trabalho empenhou-se em levantar novas questões relacionadas ao tema, utilizando modelos experimentais, técnicas e tratamentos diferentes. E que os resultados sejam parte da longa caminhada científica que aceitamos fazer.

17. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

O estudo apresentou algumas limitações, dentre elas é possível destacar o teste cognitivo. Embora o teste de campo aberto seja uma medida confiável da memória de habituação, entendemos que a utilização de outros testes seria importante para o melhor entendimento do dano cognitivo, mas infelizmente por questões de logística e espaço não foi possível sua realização. E como perspectiva, gostaríamos de investigar as proteínas presentes na interação leucócito-endotélio no modelo 2VO e também dar continuidade no projeto da IR e lesão cerebral, investigando as alterações microcirculatórias, inflamatórias e cognitivas a curto prazo e a longo prazo.

18. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

1. **Leardini-Tristão M.**; Andrade, G.; Reis, P.; Faria-Neto, H. C. C.; Tibiriçá, E. ; Estado, V. *The impact of early physical exercise on brain microcirculation, synaptic proteins and cognitive function in a chronic model of cerebral hypoperfusion.* European Society for Microcirculation and European Vascular Biology Organisation Conference. Maastricht, 2019. Travel Award for Early Career Investigators.

2. **Leardini-Tristão M.**; Borges, J. P.; Freitas, F.; Daliry, A.; Silvaes, R. R.; Tibiriçá, E.; Estado, V. *Exercício físico precoce melhora parâmetros microcirculatórios e inflamatórios cerebrais após hipoperfusão cerebral em ratos.* Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC). Araraquara, 2017.

3. **Leardini-Tristão M.**; Estado, V. ; Freitas, F. ; Borges, J. P.; Silvaes, R. R.; Daliry, A. ; Tibiriçá, E. *The impact of early or late exercise training on the cerebral microvascular alterations induced by cerebral hypoperfusion.* 26th European Meeting on Hypertension and Cardiovascular Protection, European Society of Hypertension. Paris, 2016. Accommodation Grant.

19. REFERÊNCIAS

1. Izquierdo I. Os mecanismos de formação das memórias. In: Artmed, editor. Memórias. Porto Alegre, Brasil 2011. p. 45-64.
2. Preston AR, Eichenbaum H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol.* 2013;23(17):R764-73.
3. Sacuiu SF. Dementias. *Handbook of clinical neurology.* 2016;138:123-51.
4. Pantoni L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet Neurology.* 2010;9(7):689-701.
5. Boff M.S. SFS, Bottino C.M.C. Prevalence of dementia among brazilian population: systematic review/Revisão sistemática sobre prevalência de demência entre a população brasileira. *Rev Med (São Paulo).* 2015;94(3):154-61.
6. Gorelick PB, Scuteri A, Black SE, Decarli C, Greenberg SM, Iadecola C, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke.* 2011;42(9):2672-713.
7. de la Torre JC. Critically attained threshold of cerebral hypoperfusion: the CATCH hypothesis of Alzheimer's pathogenesis. *Neurobiology of aging.* 2000;21(2):331-42.
8. Farkas E, Luiten PG. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;64(6):575-611.
9. Goto T, Maekawa K. Cerebral dysfunction after coronary artery bypass surgery. *Journal of anaesthesia.* 2014;28(2):242-8.
10. Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain research reviews.* 2007;54(1):162-80.
11. Hu Y, Zhang M, Chen Y, Yang Y, Zhang JJ. Postoperative intermittent fasting prevents hippocampal oxidative stress and memory deficits in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *European journal of nutrition.* 2019;58(1):423-32.
12. Wang Z, Fan J, Wang J, Li Y, Duan D, Du G, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces long-lasting cognitive deficits accompanied by long-term hippocampal silent synapses increase in rats. *Behavioural brain research.* 2016;301:243-52.
13. Cechetti F, Pagnussat AS, Worm PV, Elsner VR, Ben J, da Costa MS, et al. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. *Brain research bulletin.* 2012;87(1):109-16.
14. Lovic D, Manolis AJ, Lovic B, Stojanov V, Lovic M, Pittaras A, et al. The pathophysiological basis of carotid baroreceptor stimulation for the treatment of resistant hypertension. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12(1):16-22.
15. Otori T, Katsumata T, Muramatsu H, Kashiwagi F, Katayama Y, Terashi A. Long-term measurement of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clinical and experimental pharmacology & physiology.* 2003;30(4):266-72.
16. Leardini-Tristao M, Borges JP, Freitas F, Rangel R, Daliry A, Tibirica E, et al. The impact of early aerobic exercise on brain microvascular alterations induced by cerebral hypoperfusion. *Brain Res.* 2017;1657:43-51.
17. Toth P, Tarantini S, Csiszar A, Ungvari Z. Functional vascular contributions to cognitive impairment and dementia: mechanisms and consequences of cerebral autoregulatory dysfunction, endothelial impairment, and neurovascular uncoupling in aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017;312(1):H1-H20.
18. Dalkara T. Cerebral Microcirculation: An Introduction. In: Lanzer P, editor. *PanVascular Medicine.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 655-80.
19. Attwell D, Buchan AM, Charkpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* 2010;468(7321):232-43.

20. Feihl F, Liaudet L, Waeber B, Levy BI. Hypertension: a disease of the microcirculation? *Hypertension*. 2006;48(6):1012-7.
21. Schmidt-Kastner R, Truettner J, Lin B, Zhao W, Saul I, Busto R, et al. Transient changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat. *Brain research Molecular brain research*. 2001;92(1-2):157-66.
22. De Silva TM, Faraci FM. Microvascular Dysfunction and Cognitive Impairment. *Cellular and molecular neurobiology*. 2016;36(2):241-58.
23. Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol*. 2010;120(3):287-96.
24. Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*. 2013;80(4):844-66.
25. Cooper LL, Woodard T, Sigurdsson S, van Buchem MA, Torjesen AA, Inker LA, et al. Cerebrovascular Damage Mediates Relations Between Aortic Stiffness and Memory. *Hypertension*. 2016;67(1):176-82.
26. Daulatzai MA. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*. 2017;95(4):943-72.
27. Hase Y, Ding R, Harrison G, Hawthorne E, King A, Gettings S, et al. White matter capillaries in vascular and neurodegenerative dementias. *Acta neuropathologica communications*. 2019;7(1):16.
28. Kelly P, Denver P, Satchell SC, Ackermann M, Kondering MA, Mitchell CA. Microvascular ultrastructural changes precede cognitive impairment in the murine APP^{swe}/PS1^{dE9} model of Alzheimer's disease. *Angiogenesis*. 2017;20(4):567-80.
29. Sa-Pereira I, Brites D, Brito MA. Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Molecular neurobiology*. 2012;45(2):327-47.
30. Kalaria RN. Vascular basis for brain degeneration: faltering controls and risk factors for dementia. *Nutrition reviews*. 2010;68 Suppl 2:S74-87.
31. Brown WR, Thore CR. Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011;37(1):56-74.
32. Howarth C. The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. *Frontiers in neuroscience*. 2014;8:103.
33. Huang L, Nakamura Y, Lo EH, Hayakawa K. Astrocyte Signaling in the Neurovascular Unit After Central Nervous System Injury. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(2).
34. Rodriguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A. Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2016;323:170-82.
35. Wu Y, Zhang AQ, Yew DT. Age related changes of various markers of astrocytes in senescence-accelerated mice hippocampus. *Neurochemistry international*. 2005;46(7):565-74.
36. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*. 2011;93(3):421-43.
37. Olabarria M, Noristani HN, Verkhratsky A, Rodriguez JJ. Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*. 2010;58(7):831-8.
38. Kulijewicz-Nawrot M, Verkhratsky A, Chvatal A, Sykova E, Rodriguez JJ. Astrocytic cytoskeletal atrophy in the medial prefrontal cortex of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of anatomy*. 2012;221(3):252-62.
39. Liu CY, Yang Y, Ju WN, Wang X, Zhang HL. Emerging Roles of Astrocytes in Neuro-Vascular Unit and the Tripartite Synapse With Emphasis on Reactive Gliosis in the Context of Alzheimer's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2018;12:193.
40. Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron*. 2009;64(1):110-22.
41. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature medicine*. 2011;17(7):796-808.
42. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(5):779-89.

43. Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Current drug targets Cardiovascular & haematological disorders*. 2004;4(1):65-84.
44. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2013;39(1):3-18.
45. Morrison H, Young K, Qureshi M, Rowe RK, Lifshitz J. Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Scientific reports*. 2017;7(1):13211.
46. Czeh M, Gressens P, Kaindl AM. The yin and yang of microglia. *Developmental neuroscience*. 2011;33(3-4):199-209.
47. Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol*. 2018;135(3):311-36.
48. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology*. 2003;24(6):327-34.
49. Zuliani G, Cavalieri M, Galvani M, Passaro A, Munari MR, Bosi C, et al. Markers of endothelial dysfunction in older subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia. *Journal of the neurological sciences*. 2008;272(1-2):164-70.
50. Huang CW, Tsai MH, Chen NC, Chen WH, Lu YT, Lui CC, et al. Clinical significance of circulating vascular cell adhesion molecule-1 to white matter disintegrity in Alzheimer's dementia. *Thrombosis and haemostasis*. 2015;114(6):1230-40.
51. Nielsen HM, Londos E, Minthon L, Janciauskiene SM. Soluble adhesion molecules and angiotensin-converting enzyme in dementia. *Neurobiology of disease*. 2007;26(1):27-35.
52. Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, de Jesus JM, Houston Miller N, Hubbard VS, et al. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;63(25 Pt B):2960-84.
53. Lackland DT, Voeks JH. Metabolic syndrome and hypertension: regular exercise as part of lifestyle management. *Current hypertension reports*. 2014;16(11):492.
54. Billinger SA, Arena R, Bernhardt J, Eng JJ, Franklin BA, Johnson CM, et al. Physical activity and exercise recommendations for stroke survivors: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2014;45(8):2532-53.
55. Kreisel SH, Hennerici MG, Bazner H. Pathophysiology of stroke rehabilitation: the natural course of clinical recovery, use-dependent plasticity and rehabilitative outcome. *Cerebrovascular diseases*. 2007;23(4):243-55.
56. Yang L, Zhang J, Deng Y, Zhang P. The Effects of Early Exercise on Motor, Sense, and Memory Recovery in Rats With Stroke. *American journal of physical medicine & rehabilitation*. 2017;96(3):e36-e43.
57. Zhang P, Yu H, Zhou N, Zhang J, Wu Y, Zhang Y, et al. Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. *Journal of neuroengineering and rehabilitation*. 2013;10:43.
58. Gujral S, Aizenstein H, Reynolds CF, 3rd, Butters MA, Erickson KI. Exercise effects on depression: Possible neural mechanisms. *General hospital psychiatry*. 2017;49:2-10.
59. Miele EM, Headley SAE. The Effects of Chronic Aerobic Exercise on Cardiovascular Risk Factors in Persons with Diabetes Mellitus. *Current diabetes reports*. 2017;17(10):97.
60. Smiley-Oyen AL, Lowry KA, Francois SJ, Kohut ML, Ekkekakis P. Exercise, fitness, and neurocognitive function in older adults: the "selective improvement" and "cardiovascular fitness" hypotheses. *Annals of behavioral medicine : a publication of the Society of Behavioral Medicine*. 2008;36(3):280-91.
61. Smith PJ, Blumenthal JA, Hoffman BM, Cooper H, Strauman TA, Welsh-Bohmer K, et al. Aerobic exercise and neurocognitive performance: a meta-analytic review of randomized controlled trials. *Psychosomatic medicine*. 2010;72(3):239-52.
62. Holthoff VA, Marschner K, Scharf M, Steding J, Meyer S, Koch R, et al. Effects of physical activity training in patients with Alzheimer's dementia: results of a pilot RCT study. *PLoS one*. 2015;10(4):e0121478.

63. Yang SY, Shan CL, Qing H, Wang W, Zhu Y, Yin MM, et al. The Effects of Aerobic Exercise on Cognitive Function of Alzheimer's Disease Patients. *CNS & neurological disorders drug targets*. 2015;14(10):1292-7.
64. Hoffmann K, Sobol NA, Frederiksen KS, Beyer N, Vogel A, Vestergaard K, et al. Moderate-to-High Intensity Physical Exercise in Patients with Alzheimer's Disease: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2016;50(2):443-53.
65. Zhang P, Zhang Q, Pu H, Wu Y, Bai Y, Vosler PS, et al. Very early-initiated physical rehabilitation protects against ischemic brain injury. *Frontiers in bioscience*. 2012;4:2476-89.
66. Zhang Y, Zhang P, Shen X, Tian S, Wu Y, Zhu Y, et al. Early exercise protects the blood-brain barrier from ischemic brain injury via the regulation of MMP-9 and occludin in rats. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):11096-112.
67. Zhang L, Hu X, Luo J, Li L, Chen X, Huang R, et al. Physical exercise improves functional recovery through mitigation of autophagy, attenuation of apoptosis and enhancement of neurogenesis after MCAO in rats. *BMC neuroscience*. 2013;14:46.
68. Luo CX, Jiang J, Zhou QG, Zhu XJ, Wang W, Zhang ZJ, et al. Voluntary exercise-induced neurogenesis in the postischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *Journal of neuroscience research*. 2007;85(8):1637-46.
69. Klemann CJ, Roubos EW. The gray area between synapse structure and function-Gray's synapse types I and II revisited. *Synapse*. 2011;65(11):1222-30.
70. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2004;61(6):657-68.
71. Javitt DC. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Molecular psychiatry*. 2004;9(11):984-97, 79.
72. Song SH, Augustine GJ. Synapsin Isoforms and Synaptic Vesicle Trafficking. *Molecules and cells*. 2015;38(11):936-40.
73. Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, Price DL, Mouton PR. Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of neurocytology*. 1996;25(12):821-8.
74. Mukaetova-Ladinska EB, Andras A, Milne J, Abdel-All Z, Borr I, Jaros E, et al. Synaptic proteins and choline acetyltransferase loss in visual cortex in dementia with Lewy bodies. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2013;72(1):53-60.
75. Revuelta GJ, Rosso A, Lippa CF. Neuritic pathology as a correlate of synaptic loss in dementia with lewy bodies. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*. 2008;23(1):97-102.
76. Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, Jr., et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*. 2001;56(1):127-9.
77. Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1997;56(8):933-44.
78. Cassilhas RC, Lee KS, Fernandes J, Oliveira MG, Tufik S, Meeusen R, et al. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. *Neuroscience*. 2012;202:309-17.
79. Ferreira AF, Real CC, Rodrigues AC, Alves AS, Britto LR. Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain. *Brain Res*. 2010;1361:31-42.
80. Pham E, Crews L, Ubhi K, Hansen L, Adame A, Cartier A, et al. Progressive accumulation of amyloid-beta oligomers in Alzheimer's disease and in amyloid precursor protein transgenic mice is accompanied by selective alterations in synaptic scaffold proteins. *The FEBS journal*. 2010;277(14):3051-67.
81. Sultana R, Banks WA, Butterfield DA. Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of Bcl2 and caspase 3 in hippocampus from subjects with amnesic mild cognitive impairment: Insights into their potential roles for loss of synapses and memory,

- accumulation of A β , and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*. 2010;88(3):469-77.
82. Gyls KH, Fein JA, Yang F, Wiley DJ, Miller CA, Cole GM. Synaptic changes in Alzheimer's disease: increased amyloid-beta and gliosis in surviving terminals is accompanied by decreased PSD-95 fluorescence. *The American journal of pathology*. 2004;165(5):1809-17.
 83. Cechetti F, Worm PV, Elsner VR, Bertoldi K, Sanches E, Ben J, et al. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiology of learning and memory*. 2012;97(1):90-6.
 84. Wang S, Chen L, Zhang L, Huang C, Xiu Y, Wang F, et al. Effects of long-term exercise on spatial learning, memory ability, and cortical capillaries in aged rats. *Med Sci Monit*. 2015;21:945-54.
 85. Farkas E, Donka G, de Vos RA, Mihaly A, Bari F, Luiten PG. Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. *Acta Neuropathol*. 2004;108(1):57-64.
 86. Wayman C, Duricki DA, Roy LA, Haenzi B, Tsai SY, Kartje G, et al. Performing Permanent Distal Middle Cerebral with Common Carotid Artery Occlusion in Aged Rats to Study Cortical Ischemia with Sustained Disability. *J Vis Exp*. 2016(108):53106.
 87. Machado MV, Vieira AB, Nascimento AR, Martins RL, Daleprane JB, Lessa MA, et al. Physical exercise restores microvascular function in obese rats with metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord*. 2014;12(9):484-92.
 88. Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:38.
 89. Copp SW, Davis RT, Poole DC, Musch TI. Reproducibility of endurance capacity and VO₂peak in male Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol* (1985). 2009;106(4):1072-8.
 90. Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem*. 2000;7(5):333-40.
 91. Carvalho-Tavares J, Hickey MJ, Hutchison J, Michaud J, Sutcliffe IT, Kubes P. A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor- α -induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature. *Circ Res*. 2000;87(12):1141-8.
 92. Kataoka H, Kim SW, Plesnila N. Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24(6):668-76.
 93. Araujo CV, Estado V, Tibirica E, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Silva AR. PPAR γ activation protects the brain against microvascular dysfunction in sepsis. *Microvasc Res*. 2012;84(2):218-21.
 94. Estado V, Obadia N, Carvalho-Tavares J, Freitas FS, Reis P, Castro-Faria Neto H, et al. Blockade of the renin-angiotensin system improves cerebral microcirculatory perfusion in diabetic hypertensive rats. *Microvasc Res*. 2013;87:41-9.
 95. Cordovil I, Huguenin G, Rosa G, Bello A, Kohler O, de Moraes R, et al. Evaluation of systemic microvascular endothelial function using laser speckle contrast imaging. *Microvasc Res*. 2012;83(3):376-9.
 96. Eriksson S, Nilsson J, Stureson C. Non-invasive imaging of microcirculation: a technology review. *Med Devices (Auckl)*. 2014;7:445-52.
 97. Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*. 2012(65).
 98. Hoops D. A perfusion protocol for lizards, including a method for brain removal. *MethodsX*. 2015;2:165-73.
 99. da Fonseca AC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, et al. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:362.
 100. Cardoso FL, Herz J, Fernandes A, Rocha J, Sepodes B, Brito MA, et al. Systemic inflammation in early neonatal mice induces transient and lasting neurodegenerative effects. *J Neuroinflammation*. 2015;12:82.

101. Lammie GA, Brannan F, Slattery J, Warlow C. Nonhypertensive cerebral small-vessel disease. An autopsy study. *Stroke*. 1997;28(11):2222-9.
102. De Jong GI, Farkas E, Stienstra CM, Plass JR, Keijser JN, de la Torre JC, et al. Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment. *Neuroscience*. 1999;91(1):203-10.
103. Farkas E, De Jong GI, Apro E, De Vos RA, Steur EN, Luiten PG. Similar ultrastructural breakdown of cerebrocortical capillaries in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and experimental hypertension. What is the functional link? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;903:72-82.
104. Tsuchiya M, Sako K, Yura S, Yonemasu Y. Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Experimental brain research*. 1992;89(1):87-92.
105. Tomimoto H, Ihara M, Wakita H, Ohtani R, Lin JX, Akiguchi I, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces white matter lesions and loss of oligodendroglia with DNA fragmentation in the rat. *Acta Neuropathol*. 2003;106(6):527-34.
106. Bell MA, Ball MJ. Morphometric comparison of hippocampal microvasculature in ageing and demented people: diameters and densities. *Acta Neuropathol*. 1981;53(4):299-318.
107. Murugesan N, Demarest TG, Madri JA, Pachter JS. Brain regional angiogenic potential at the neurovascular unit during normal aging. *Neurobiology of aging*. 2012;33(5):1004 e1-16.
108. Klein AW, Michel ME. A morphometric study of the neocortex of young adult and old maze-differentiated rats. *Mechanisms of ageing and development*. 1977;6(6):441-52.
109. Wilkinson JH, Hopewell JW, Reinhold HS. A quantitative study of age-related changes in the vascular architecture of the rat cerebral cortex. *Neuropathology and applied neurobiology*. 1981;7(6):451-62.
110. Mann DM, Eaves NR, Marcyniuk B, Yates PO. Quantitative changes in cerebral cortical microvasculature in ageing and dementia. *Neurobiology of aging*. 1986;7(5):321-30.
111. Hunziker O, Abdel'Al S, Schulz U. The aging human cerebral cortex: a stereological characterization of changes in the capillary net. *Journal of gerontology*. 1979;34(3):345-50.
112. Riddle DR, Sonntag WE, Lichtenwalner RJ. Microvascular plasticity in aging. *Ageing Res Rev*. 2003;2(2):149-68.
113. Knox CA, Oliveira A. Brain aging in normotensive and hypertensive strains of rats. III. A quantitative study of cerebrovasculature. *Acta Neuropathol*. 1980;52(1):17-25.
114. Huang Y, Zhang W, Lin L, Feng J, Chen F, Wei W, et al. Is endothelial dysfunction of cerebral small vessel responsible for white matter lesions after chronic cerebral hypoperfusion in rats? *Journal of the neurological sciences*. 2010;299(1-2):72-80.
115. Yata K, Nishimura Y, Uekawa M, Tomita Y, Suzuki N, Tanaka T, et al. In vivo imaging of the mouse neurovascular unit under chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*. 2014;45(12):3698-703.
116. Cheng Y, Zhang Y, Song H, Feng J. Intercellular adhesion molecule-1 expression in the hippocampal CA1 region of hyperlipidemic rats with chronic cerebral ischemia. *Neural regeneration research*. 2012;7(17):1312-7.
117. Parra RS, Mendes LA, Fazan R, Jr., Salgado HC. Pressure response to carotid occlusion in diabetic rats: effect of insulin therapy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;68(1):12-7.
118. Goessler K, Polito M, Cornelissen VA. Effect of exercise training on the renin-angiotensin-aldosterone system in healthy individuals: a systematic review and meta-analysis. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2016;39(3):119-26.
119. Machado MV, Vieira AB, da Conceicao FG, Nascimento AR, da Nobrega ACL, Tibirica E. Exercise training dose differentially alters muscle and heart capillary density and metabolic functions in an obese rat with metabolic syndrome. *Experimental physiology*. 2017;102(12):1716-28.
120. Rossoni LV, Oliveira RA, Caffaro RR, Miana M, Sanz-Rosa D, Koike MK, et al. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. *Journal of hypertension*. 2011;29(12):2349-58.
121. Diaz KM, Shimbo D. Physical activity and the prevention of hypertension. *Current hypertension reports*. 2013;15(6):659-68.

122. Ding YH, Li J, Zhou Y, Rafols JA, Clark JC, Ding Y. Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Current neurovascular research*. 2006;3(1):15-23.
123. Rhyu IJ, Bytheway JA, Kohler SJ, Lange H, Lee KJ, Boklewski J, et al. Effects of aerobic exercise training on cognitive function and cortical vascularity in monkeys. *Neuroscience*. 2010;167(4):1239-48.
124. Swain RA, Harris AB, Wiener EC, Dutka MV, Morris HD, Theien BE, et al. Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience*. 2003;117(4):1037-46.
125. Huang CX, Qiu X, Wang S, Wu H, Xia L, Li C, et al. Exercise-induced changes of the capillaries in the cortex of middle-aged rats. *Neuroscience*. 2013;233:139-45.
126. Choy M, Ganesan V, Thomas DL, Thornton JS, Proctor E, King MD, et al. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2006;26(8):1066-75.
127. Oldendorf WH. Trophic changes in the arteries at the base of the rat brain in response to bilateral common carotid ligation. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1989;48(5):534-47.
128. Ohtaki H, Fujimoto T, Sato T, Kishimoto K, Fujimoto M, Moriya M, et al. Progressive expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis after chronic ischemic hypoperfusion in rat. *Acta Neurochir Suppl*. 2006;96:283-7.
129. Zou W, Song Y, Li Y, Du Y, Zhang X, Fu J. The Role of Autophagy in the Correlation Between Neuron Damage and Cognitive Impairment in Rat Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Molecular neurobiology*. 2018;55(1):776-91.
130. Soria G, Tudela R, Marquez-Martin A, Camon L, Batalle D, Munoz-Moreno E, et al. The ins and outs of the BCCAO model for chronic hypoperfusion: a multimodal and longitudinal MRI approach. *PloS one*. 2013;8(9):e74631.
131. Wightman EL, Haskell-Ramsay CF, Thompson KG, Blackwell JR, Winyard PG, Forster J, et al. Dietary nitrate modulates cerebral blood flow parameters and cognitive performance in humans: A double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. *Physiology & behavior*. 2015;149:149-58.
132. McGaugh JL. Memory--a century of consolidation. *Science*. 2000;287(5451):248-51.
133. Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory*. 1997;68(3):285-316.
134. Sarti C, Pantoni L, Bartolini L, Inzitari D. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. *Journal of the neurological sciences*. 2002;203-204:263-6.
135. Jiwa NS, Garrard P, Hainsworth AH. Experimental models of vascular dementia and vascular cognitive impairment: a systematic review. *Journal of neurochemistry*. 2010;115(4):814-28.
136. Choi DH, Lee KH, Lee J. Effect of exercise-induced neurogenesis on cognitive function deficit in a rat model of vascular dementia. *Molecular medicine reports*. 2016;13(4):2981-90.
137. Shibata M, Yamasaki N, Miyakawa T, Kalaria RN, Fujita Y, Ohtani R, et al. Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke*. 2007;38(10):2826-32.
138. Reis PA, Comim CM, Hermani F, Silva B, Barichello T, Portella AC, et al. Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *PLoS pathogens*. 2010;6(6):e1000963.
139. Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2008;80(2):301-9.
140. Reis PA, Estado V, da Silva TI, d'Avila JC, Siqueira LD, Assis EF, et al. Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS pathogens*. 2012;8(12):e1003099.

141. Guo XJ, Tian XS, Ruan Z, Chen YT, Wu L, Gong Q, et al. Dysregulation of neurotrophic and inflammatory systems accompanied by decreased CREB signaling in ischemic rat retina. *Experimental eye research*. 2014;125:156-63.
142. Sivilia S, Giuliani A, Fernandez M, Turba ME, Forni M, Massella A, et al. Intravitreal NGF administration counteracts retina degeneration after permanent carotid artery occlusion in rat. *BMC neuroscience*. 2009;10:52.
143. Kalesnykas G, Tuulos T, Uusitalo H, Jolkkonen J. Neurodegeneration and cellular stress in the retina and optic nerve in rat cerebral ischemia and hypoperfusion models. *Neuroscience*. 2008;155(3):937-47.
144. Jeon YK, Ha CH. The effect of exercise intensity on brain derived neurotrophic factor and memory in adolescents. *Environmental health and preventive medicine*. 2017;22(1):27.
145. Lin Y, Dong J, Yan T, He X, Zheng X, Liang H, et al. Involuntary, forced and voluntary exercises are equally capable of inducing hippocampal plasticity and the recovery of cognitive function after stroke. *Neurological research*. 2015;37(10):893-901.
146. Cai M, Wang H, Li JJ, Zhang YL, Xin L, Li F, et al. The signaling mechanisms of hippocampal endoplasmic reticulum stress affecting neuronal plasticity-related protein levels in high fat diet-induced obese rats and the regulation of aerobic exercise. *Brain, behavior, and immunity*. 2016;57:347-59.
147. McConnell HL, Kersch CN, Woltjer RL, Neuwelt EA. The Translational Significance of the Neurovascular Unit. *The Journal of biological chemistry*. 2017;292(3):762-70.
148. Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang GY. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Progress in neurobiology*. 2017;157:247-72.
149. Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *Journal of neuroimmunology*. 2009;210(1-2):3-12.
150. Lana D, Ugolini F, Melani A, Nosi D, Pedata F, Giovannini MG. The neuron-astrocyte-microglia triad in CA3 after chronic cerebral hypoperfusion in the rat: Protective effect of dipyridamole. *Experimental gerontology*. 2017;96:46-62.
151. He XF, Liu DX, Zhang Q, Liang FY, Dai GY, Zeng JS, et al. Voluntary Exercise Promotes Glymphatic Clearance of Amyloid Beta and Reduces the Activation of Astrocytes and Microglia in Aged Mice. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2017;10:144.
152. Littlefield AM, Setti SE, Priester C, Kohman RA. Voluntary exercise attenuates LPS-induced reductions in neurogenesis and increases microglia expression of a proneurogenic phenotype in aged mice. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12:138.
153. Kohman RA, DeYoung EK, Bhattacharya TK, Peterson LN, Rhodes JS. Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain, behavior, and immunity*. 2012;26(5):803-10.
154. Jiang T, Zhang L, Pan X, Zheng H, Chen X, Li L, et al. Physical Exercise Improves Cognitive Function Together with Microglia Phenotype Modulation and Remyelination in Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Front Cell Neurosci*. 2017;11:404.
155. Lee JM, Kim CJ, Park JM, Song MK, Kim YJ. Effect of treadmill exercise on spatial navigation impairment associated with cerebellar Purkinje cell loss following chronic cerebral hypoperfusion. *Molecular medicine reports*. 2018;17(6):8121-8.
156. Lee JM, Park JM, Song MK, Oh YJ, Kim CJ, Kim YJ. The ameliorative effects of exercise on cognitive impairment and white matter injury from blood-brain barrier disruption induced by chronic cerebral hypoperfusion in adolescent rats. *Neuroscience letters*. 2017;638:83-9.
157. Kubotera H, Ikeshima-Kataoka H, Hatashita Y, Allegra Mascaro AL, Pavone FS, Inoue T. Astrocytic endfeet re-cover blood vessels after removal by laser ablation. *Scientific reports*. 2019;9(1):1263.
158. Reprint: 2013 AHA/ACC Guideline on Lifestyle Management to Reduce Cardiovascular Risk. *Journal of the American Pharmacists Association : JAPhA*. 2013:e2.

159. Saur L, Baptista PP, de Senna PN, Paim MF, do Nascimento P, Ilha J, et al. Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. *Brain Struct Funct.* 2014;219(1):293-302.
160. Lundquist AJ, Parizher J, Petzinger GM, Jakowec MW. Exercise induces region-specific remodeling of astrocyte morphology and reactive astrocyte gene expression patterns in male mice. *Journal of neuroscience research.* 2019;97(9):1081-94.
161. Alvarez JI, Katayama T, Prat A. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia.* 2013;61(12):1939-58.
162. McCall MA, Gregg RG, Behringer RR, Brenner M, Delaney CL, Galbreath EJ, et al. Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996;93(13):6361-6.
163. Prebil M, Jensen J, Zorec R, Kreft M. Astrocytes and energy metabolism. *Arch Physiol Biochem.* 2011;117(2):64-9.
164. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG, et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33 Suppl 1:S1-75.
165. Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet.* 2013;382(9901):1329-40.
166. Cheng SW, Wu LL, Lau H, Ting AC, Wong J. Prevalence of significant carotid stenosis in Chinese patients with peripheral and coronary artery disease. *Aust N Z J Surg.* 1999;69(1):44-7.
167. Mathiesen EB, Joakimsen O, Bonna KH. Prevalence of and risk factors associated with carotid artery stenosis: the Tromso Study. *Cerebrovasc Dis.* 2001;12(1):44-51.
168. Zhang L, Chopp M, Zhang Y, Xiong Y, Li C, Sadry N, et al. Diabetes Mellitus Impairs Cognitive Function in Middle-Aged Rats and Neurological Recovery in Middle-Aged Rats After Stroke. *Stroke.* 2016;47(8):2112-8.
169. Moheet A, Mangia S, Seaquist ER. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2015;1353:60-71.
170. Moonga I, Niccolini F, Wilson H, Pagano G, Politis M. Hypertension is associated with worse cognitive function and hippocampal hypometabolism in Alzheimer's disease. *European journal of neurology.* 2017;24(9):1173-82.
171. Dik MG, Jonker C, Comijs HC, Deeg DJ, Kok A, Yaffe K, et al. Contribution of metabolic syndrome components to cognition in older individuals. *Diabetes Care.* 2007;30(10):2655-60.
172. Snyder HM, Corriveau RA, Craft S, Faber JE, Greenberg SM, Knopman D, et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia including Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association.* 2015;11(6):710-7.
173. Baumgart M, Snyder HM, Carrillo MC, Fazio S, Kim H, Johns H. Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association.* 2015;11(6):718-26.
174. Wang W, Yin J, Ma X, Zhao F, Siedlak SL, Wang Z, et al. Inhibition of mitochondrial fragmentation protects against Alzheimer's disease in rodent model. *Hum Mol Genet.* 2017;26(21):4118-31.
175. Obadia N, Lessa MA, Daliry A, Silveiras RR, Gomes F, Tibirica E, et al. Cerebral microvascular dysfunction in metabolic syndrome is exacerbated by ischemia-reperfusion injury. *BMC Neurosci.* 2017;18(1):67.
176. Lejay A, Laverny G, Paradis S, Schlagowski AI, Charles AL, Singh F, et al. Moderate Exercise Allows for shorter Recovery Time in Critical Limb Ischemia. *Front Physiol.* 2017;8:523.
177. Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World journal of surgery.* 2002;26(1):115-21.
178. Peng TC, Jan WC, Tsai PS, Huang CJ. Heme oxygenase-1 mediates the protective effects of ischemic preconditioning on mitigating lung injury induced by lower limb ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res.* 2011;167(2):e245-53.

179. Nie RG, McCarter SD, Harris KA, Lee PJ, Zhang X, Bihari A, et al. The role of endogenous heme oxygenase in the initiation of liver injury following limb ischemia/reperfusion. *J Hepatol.* 2002;36(5):624-30.
180. Karimi N, Haghani M, Noorafshan A, Moosavi SMS. Structural and functional disorders of hippocampus following ischemia/reperfusion in lower limbs and kidneys. *Neuroscience.* 2017;358:238-48.
181. Chen Y, Zhou J, Li J, Yang SB, Mo LQ, Hu JH, et al. Electroacupuncture pretreatment prevents cognitive impairment induced by limb ischemia-reperfusion via inhibition of microglial activation and attenuation of oxidative stress in rats. *Brain Res.* 2012;1432:36-45.
182. Hussein OA, Abdel-Hafez AMM, Abd El Kareim A. Rat hippocampal CA3 neuronal injury induced by limb ischemia/reperfusion: A possible restorative effect of alpha lipoic acid. *Ultrastruct Pathol.* 2018;42(2):133-54.
183. Leardini-Tristao M, Charles AL, Lejay A, Pizzimenti M, Meyer A, Estado V, et al. Beneficial Effect of Exercise on Cognitive Function during Peripheral Arterial Disease: Potential Involvement of Myokines and Microglial Anti-Inflammatory Phenotype Enhancement. *J Clin Med.* 2019;8(5).
184. Girn HR, Ahilathirunayagam S, Mavor AI, Homer-Vanniasinkam S. Reperfusion syndrome: cellular mechanisms of microvascular dysfunction and potential therapeutic strategies. *Vasc Endovascular Surg.* 2007;41(4):277-93.
185. Paradis S, Charles AL, Meyer A, Lejay A, Scholey JW, Chakfe N, et al. Chronology of mitochondrial and cellular events during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *American journal of physiology Cell physiology.* 2016;310(11):C968-82.
186. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol.* 1960;70:68-78.
187. Ishikawa M, Zhang JH, Nanda A, Granger DN. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in the cerebral microcirculation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2004;9:1339-47.
188. Guillot M, Charles AL, Chamaroux-Tran TN, Bouitbir J, Meyer A, Zoll J, et al. Oxidative stress precedes skeletal muscle mitochondrial dysfunction during experimental aortic cross-clamping but is not associated with early lung, heart, brain, liver, or kidney mitochondrial impairment. *J Vasc Surg.* 2014;60(4):1043-51 e5.
189. J OU, Ryu SY, Jhun BS, Hurst S, Sheu SS. Mitochondrial ion channels/transporters as sensors and regulators of cellular redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21(6):987-1006.
190. Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res.* 2012;111(9):1198-207.
191. Sousa JS, D'Imprima E, Vonck J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Subcell Biochem.* 2018;87:167-227.
192. Koopman WJ, Verkaart S, Visch HJ, van Emst-de Vries S, Nijtmans LG, Smeitink JA, et al. Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology? *American journal of physiology Cell physiology.* 2007;293(1):C22-9.
193. Papa S, Martino PL, Capitano G, Gaballo A, De Rasmio D, Signorile A, et al. The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology.* 2012;942:3-37.
194. Chistiakov DA, Sobenin IA, Revin VV, Orekhov AN, Bobryshev YV. Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *Biomed Res Int.* 2014;2014:238463.
195. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408(6809):239-47.
196. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Journal of hypertension.* 2000;18(6):655-73.
197. Zhao Y, Zhao B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2013;2013:316523.
198. Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature reviews Drug discovery.* 2004;3(3):205-14.

199. Pieczenik SR, Neustadt J. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and molecular pathology*. 2007;83(1):84-92.
200. Rossi MJ, Pekkurnaz G. Powerhouse of the mind: mitochondrial plasticity at the synapse. *Curr Opin Neurobiol*. 2019;57:149-55.
201. Chen Z, Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies. *Progress in neurobiology*. 2013;108:21-43.
202. Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2015;74:101-10.
203. Pottecher J, Guillot M, Belaidi E, Charles AL, Lejay A, Gharib A, et al. Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg*. 2013;57(4):1100-8 e2.
204. Pottecher J, Kindo M, Chamaraux-Tran TN, Charles AL, Lejay A, Kemmel V, et al. Skeletal muscle ischemia-reperfusion injury and cyclosporine A in the aging rat. *Fundam Clin Pharmacol*. 2016;30(3):216-25.
205. Talha S, Bouitbir J, Charles AL, Zoll J, Goette-Di Marco P, Meziani F, et al. Pretreatment with brain natriuretic peptide reduces skeletal muscle mitochondrial dysfunction and oxidative stress after ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* (1985). 2013;114(2):172-9.
206. Ahmad F, Murata T, Shimizu K, Degerman E, Maurice D, Manganiello V. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: important signaling modulators and therapeutic targets. *Oral Dis*. 2015;21(1):e25-50.
207. Tetsi L, Charles AL, Paradis S, Lejay A, Talha S, Geny B, et al. Effects of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) on mitochondrial skeletal muscle functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2017;74(10):1883-93.
208. Bollen E, Prickaerts J. Phosphodiesterases in neurodegenerative disorders. *IUBMB Life*. 2012;64(12):965-70.
209. Domek-Lopacinska K, Strosznajder JB. The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain Res*. 2008;1216:68-77.
210. Palmeri A, Privitera L, Giunta S, Loreto C, Puzzo D. Inhibition of phosphodiesterase-5 rescues age-related impairment of synaptic plasticity and memory. *Behav Brain Res*. 2013;240:11-20.
211. Puzzo D, Staniszewski A, Deng SX, Privitera L, Leznik E, Liu S, et al. Phosphodiesterase 5 inhibition improves synaptic function, memory, and amyloid-beta load in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci*. 2009;29(25):8075-86.
212. Saavedra A, Giralt A, Arumi H, Alberch J, Perez-Navarro E. Regulation of hippocampal cGMP levels as a candidate to treat cognitive deficits in Huntington's disease. *PLoS One*. 2013;8(9):e73664.
213. Kleppisch T, Feil R. cGMP signalling in the mammalian brain: role in synaptic plasticity and behaviour. *Handb Exp Pharmacol*. 2009(191):549-79.
214. Van Staveren WC, Steinbusch HW, Markerink-Van Ittersum M, Repaske DR, Goy MF, Kotera J, et al. mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. *J Comp Neurol*. 2003;467(4):566-80.
215. Hinkle RT, Dolan E, Cody DB, Bauer MB, Isfort RJ. Phosphodiesterase 4 inhibition reduces skeletal muscle atrophy. *Muscle & nerve*. 2005;32(6):775-81.
216. Gomez-Vallejo V, Ugarte A, Garcia-Barroso C, Cuadrado-Tejedor M, Szczupak B, Dopeso-Reyes IG, et al. Pharmacokinetic investigation of sildenafil using positron emission tomography and determination of its effect on cerebrospinal fluid cGMP levels. *J Neurochem*. 2016;136(2):403-15.
217. Cuadrado-Tejedor M, Hervias I, Ricobaraza A, Puerta E, Perez-Roldan JM, Garcia-Barroso C, et al. Sildenafil restores cognitive function without affecting beta-amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol*. 2011;164(8):2029-41.
218. Zhang R, Wang Y, Zhang L, Zhang Z, Tsang W, Lu M, et al. Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke*. 2002;33(11):2675-80.

219. Gong B, Vitolo OV, Trinchese F, Liu S, Shelanski M, Arancio O. Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(11):1624-34.
220. Cheng YF, Wang C, Lin HB, Li YF, Huang Y, Xu JP, et al. Inhibition of phosphodiesterase-4 reverses memory deficits produced by Abeta25-35 or Abeta1-40 peptide in rats. *Psychopharmacology*. 2010;212(2):181-91.
221. Zhong Y, Zhu Y, He T, Li W, Yan H, Miao Y. Rolipram-induced improvement of cognitive function correlates with changes in hippocampal CREB phosphorylation, BDNF and Arc protein levels. *Neuroscience letters*. 2016;610:171-6.
222. Jabariss SS, Sumathy H, Girish R, Narayanan S, Sugumar M, Saravana Babu C, et al. Phosphodiesterase-4 inhibitors ameliorates cognitive deficits in deoxycorticosterone acetate induced hypertensive rats via cAMP/CREB signaling system. *Brain Res*. 2015;1622:279-91.
223. Tran TP, Tu H, Liu J, Muelleman RL, Li YL. Mitochondria-derived superoxide links to tourniquet-induced apoptosis in mouse skeletal muscle. *PLoS One*. 2012;7(8):e43410.
224. Mansour Z, Charles AL, Kindo M, Pottecher J, Chamaroux-Tran TN, Lejay A, et al. Remote effects of lower limb ischemia-reperfusion: impaired lung, unchanged liver, and stimulated kidney oxidative capacities. *Biomed Res Int*. 2014;2014:392390.
225. Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc*. 2008;3(6):965-76.
226. Karlsson M, Hempel C, Sjovall F, Hansson MJ, Kurtzhals JA, Elmer E. Brain mitochondrial function in a murine model of cerebral malaria and the therapeutic effects of rhEPO. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(1):151-5.
227. Charles AL, Guilbert AS, Bouitbir J, Goette-Di Marco P, Enache I, Zoll J, et al. Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *The British journal of surgery*. 2011;98(4):511-6.
228. Rekuviene E, Ivanoviene L, Borutaite V, Morkuniene R. Data on effects of rotenone on calcium retention capacity, respiration and activities of respiratory chain complexes I and II in isolated rat brain mitochondria. *Data in brief*. 2017;13:707-12.
229. Davies MJ. Detection and characterisation of radicals using electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping and related methods. *Methods*. 2016;109:21-30.
230. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 2007;49(4):717-27.
231. Koutakis P, Weiss DJ, Miserlis D, Shostrom VK, Papoutsi E, Ha DM, et al. Oxidative damage in the gastrocnemius of patients with peripheral artery disease is myofiber type selective. *Redox Biol*. 2014;2:921-8.
232. Pottecher J, Adamopoulos C, Lejay A, Bouitbir J, Charles AL, Meyer A, et al. Diabetes Worsens Skeletal Muscle Mitochondrial Function, Oxidative Stress, and Apoptosis After Lower-Limb Ischemia-Reperfusion: Implication of the RISK and SAFE Pathways? *Front Physiol*. 2018;9:579.
233. Tetsi L, Charles AL, Georg I, Goupilleau F, Lejay A, Talha S, et al. Effect of the Phosphodiesterase 5 Inhibitor Sildenafil on Ischemia-Reperfusion-Induced Muscle Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. *Antioxidants*. 2019;8(4).
234. Adembri C, Kastamoniti E, Bertolozzi I, Vanni S, Dorigo W, Coppo M, et al. Pulmonary injury follows systemic inflammatory reaction in infrarenal aortic surgery. *Critical care medicine*. 2004;32(5):1170-7.
235. Bianco-Batlles MD, Sosunov A, Polin RA, Ten VS. Systemic inflammation following hind-limb ischemia-reperfusion affects brain in neonatal mice. *Developmental neuroscience*. 2008;30(6):367-73.
236. Koka S, Das A, Salloum FN, Kukreja RC. Phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil attenuates oxidative stress and protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in type 2 diabetic mice. *Free radical biology & medicine*. 2013;60:80-8.

237. Wang G, Zhang Q, Yuan W, Wu J, Li C. Sildenafil Protects against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Following Cardiac Arrest in a Porcine Model: Possible Role of the Renin-Angiotensin System. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(11):27015-31.
238. Kwak HJ, Park KM, Choi HE, Chung KS, Lim HJ, Park HY. PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways. *Cellular signalling*. 2008;20(5):803-14.
239. Mohey V, Singh M, Puri N, Kaur T, Pathak D, Singh AP. Sildenafil obviates ischemia-reperfusion injury-induced acute kidney injury through peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism in rats. *The Journal of surgical research*. 2016;201(1):69-75.
240. Mammadov E, Aridogan IA, Izol V, Acikalin A, Abat D, Tuli A, et al. Protective effects of phosphodiesterase-4-specific inhibitor rolipram on acute ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *Urology*. 2012;80(6):1390 e1-6.
241. Armstrong DM, Armstrong Ada C, Figueiredo RC, Florentino JE, Saad PF, Fox-Talbot K, et al. Sildenafil citrate protects skeletal muscle of ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical study in rat model. *Acta cirurgica brasileira*. 2013;28(4):282-7.
242. Bingham J, Sudarsanam S, Srinivasan S. Profiling human phosphodiesterase genes and splice isoforms. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;350(1):25-32.
243. Nio Y, Tanaka M, Hirozane Y, Muraki Y, Okawara M, Hazama M, et al. Phosphodiesterase 4 inhibitor and phosphodiesterase 5 inhibitor combination therapy has antifibrotic and anti-inflammatory effects in mdx mice with Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J*. 2017;31(12):5307-20.
244. Kubota S, Watanabe M, Shirato M, Okuno T, Higashimoto I, Machida K, et al. An inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor E6005 suppresses pulmonary inflammation in mice. *Eur J Pharmacol*. 2015;768:41-8.
245. Ozbeyli D, Gokalp AG, Koral T, Ocal OY, Dogan B, Akakin D, et al. Protective effect of exercise and sildenafil on acute stress and cognitive function. *Physiol Behav*. 2015;151:230-7.
246. Soares LM, De Vry J, Steinbusch HWM, Milani H, Prickaerts J, Weffort de Oliveira RM. Rolipram improves cognition, reduces anxiety- and despair-like behaviors and impacts hippocampal neuroplasticity after transient global cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2016;326:69-83.
247. Rutten K, Prickaerts J, Schaenzle G, Rosenbrock H, Blokland A. Sub-chronic rolipram treatment leads to a persistent improvement in long-term object memory in rats. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;90(3):569-75.

ANEXOS

Anexo I – artículo publicado: *Beneficial Effect of Exercise on Cognitive Function during Peripheral Arterial Disease: Potential Involvement of Myokines and Microglial Anti-Inflammatory Phenotype Enhancement.*

Beneficial Effect of Exercise on Cognitive Function during Peripheral Arterial Disease: Potential Involvement of Myokines and Microglial Anti-Inflammatory Phenotype Enhancement

Marina Leardini-Tristão ¹, Anne-Laure Charles ², Anne Lejay ^{2,3}, Mégane Pizzimenti ², Alain Meyer ^{2,4}, Vanessa Estato ¹, Eduardo Tibiriçá ⁵, Emmanuel Andres ⁶, and Bernard Geny ^{2,4,*}

¹ Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, 21040-360, Rio de Janeiro, Brasil; tristaomarina@gmail.com (M.L.-T.); estado@ioc.fiocruz.br (V.E.)

² Université de Strasbourg, Fédération de médecine translationnelle de Strasbourg (FMTS), Faculté de Médecine, Equipe d'accueil 3072, 11 Rue Humann, 67000 Strasbourg, France; anne.laure.charles@unistra.fr (A.L.-C.); anne.lejay@chru-strasbourg.fr (A.L.); megane.pizzimenti@hotmail.fr (M.P.); alain.meyer1@chru-strasbourg.fr (A.M.)

³ Service de Chirurgie Cardiovasculaire, Pôle de Pathologie Cardiaque, Hôpitaux Universitaires, CHRU Strasbourg, 67000 Cedex, France

⁴ Service de Physiologie et d'explorations Fonctionnelles, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Nouvel Hôpital Civil, 1 place de l'Hôpital, 67091 Strasbourg Cedex, France

⁵ Instituto Nacional de Cardiologia, Ministério da Saúde, Rua das lanjeiras 374, 22240-006, Rio de Janeiro, Brasil; etibi@uol.com.br

⁶ Service de Médecine Interne, Diabète et Maladies Métaboliques, Pôle M.I.R.N.E.D., Hôpitaux Universitaires, CHRU Strasbourg, 67000 Cedex, France; emmanuel.andres@chru-strasbourg.fr

* Correspondence: bernard.geny@chru-strasbourg.fr

Received: 05 March 2019; Accepted: 7 May 2019; Published: 10 May 2019

Abstract: Peripheral arterial disease (PAD), leading to intermittent claudication, critical ischemia with rest pain, and/or tissue damage, is a public health issue associated with significant morbidity and mortality. Little is known about the link between PAD, cognitive function, and whether exercise might reduce cognitive dysfunction in PAD patients, as previously observed concerning both quality of life and prognosis. This review highlights the fact that patients suffering from PAD often demonstrate cognitive dysfunction characterized by reduced performance in nonverbal reasoning, reduced verbal fluency, and decreased information processing speed and a greater risk for progression toward dementia. Further, the data presented support that physical exercise, likely through myokine secretion and microglial anti-inflammatory phenotype enhancement, might participate in the cognition protection in common clinical settings.

Keywords: peripheral arterial disease; ankle-brachial index; cognitive dysfunction; brain; exercise; myokines; microglia; BDNF; cathepsin-B; irisin

1. Introduction

Peripheral arterial disease (PAD) is a public health issue resulting in significant morbidity and mortality. Its prevalence ranges from 4 to 8% in Europe, reaching 13% in 70-year-old patients. First classified by Fontaine and Leriche in four stages, asymptomatic PAD (stage I); mild claudication (stage II a); moderate to severe claudication (stage II b); ischemic rest pain (stage III); and ulceration or gangrene (stage IV); PAD is now classified in intermittent claudication and critical ischemia with rest pain and/or tissue damage [1–5]. To avoid local damage which might lead to limb amputation and to

reduce death occurrence, several therapeutic approaches have been tested, including exercise. Indeed, low exercise capacity is significantly associated with severe comorbidities [6] and exercise improved both local and general prognosis in patients suffering from PAD, enhancing walking ability and preventing serious cardiovascular complications [7–10]. At a cellular level, the beneficial effects of exercise can be explained by improvements in muscle biogenesis, mitochondrial function, and energy balance [11]. Even in the case of chronic critical limb ischemia, experimental data support that moderate exercise can reduce skeletal muscle damage, improving functional scores, restoring mitochondrial respiration and calcium retention capacity, and enhancing anti-oxidant defenses, such as superoxide dismutase 1 and 2, and catalase [12].

Therefore, exercise, either performed in hospital or out of hospital facilities, is a widely accepted therapy, ameliorating muscle function and more generally PAD patient’s quality of life [13].

To date, limited data have been reported concerning the relationship between PAD and brain function and whether exercise might improve cognition in patients with PAD. However, evidence supports that several types of exercise improve cognitive performance in humans [14,15].

The aim of this review is to highlight the fact that patients suffering from PAD often demonstrate with cognitive dysfunction and that exercise, likely through myokine secretion and microglial anti-inflammatory phenotype enhancement, might help to protect the brain function in common clinical settings.

2. Cognitive Function in Patients with Peripheral Arterial Disease

PAD patients are often viewed as presenting with cognitive dysfunction. Such impaired cognitive processes are not unexpected since both diseases share common cardiovascular risk factors, such as hypertension, diabetes, hypercholesterolemia, obesity, sedentary lifestyle, and smoking [5,16–19]. More specifically, inflammation, oxidative stress, mitochondrial, and vascular dysfunction are key factors in the pathophysiology of both PAD and neurodegenerative diseases [12,20–22]. Thus, although an experimental study failed to demonstrated brain mitochondrial dysfunction in the setting of aortic clamping [23], peripheral inflammatory factors released during the ischemic process have been shown to impair several remote organs, including the brain [24,25] (Figure 1).

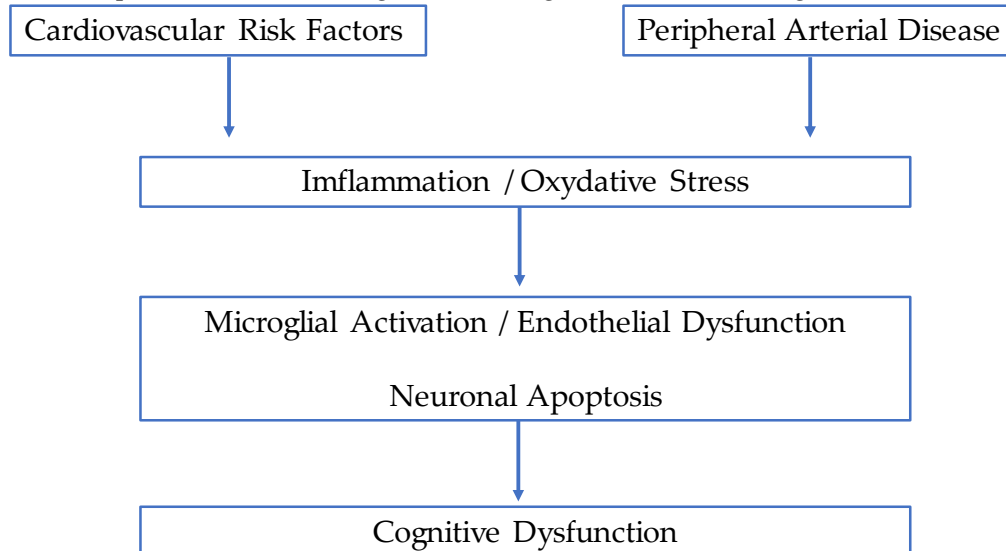


Figure 1. Mechanisms leading to cognitive dysfunction in peripheral arterial disease (PAD) patients.

2.1. Main Clinical Data

Recently, confirming experimental data, clinical trials have shown the presence of cerebrovascular disease in the context of PAD [26–29]. Thus, compared to hypertensives and normotensives patients, patients with PAD had significantly lower performance on seven tests of nonverbal memory, concentration, executive function, perception-motor speed, and manual dexterity. However, PAD patients performed better than stroke patients. These results were independent of age, education, and depression scores. PAD patients with higher plasma glucose levels and diastolic blood pressure had a worse performance in cognitive tests [27]. The findings also suggest that the degree of cognitive dysfunction is associated with increasingly severe indicators of cardiovascular disease.

In 2006, a study investigated the cognitive function of patients with asymptomatic peripheral arterial disease, without the occurrence of stroke or transient ischemic attacks. The results showed that the patients scored worse than healthy controls on five cognitive tests (digit span backward, trail making A and B, and Rey–Osterrieth complex figure copy and delayed recall), related to attention, verbal working memory, perceptuo-motor speed, visuo-constructive skills, and visual memory [30].

Cognitive function was also studied in patients with PAD or diabetes mellitus who underwent lower limb amputation. Patients were investigated before amputation and 6 weeks and 4 months after amputation. No significant differences were found in neuropsychological tests between 6 weeks and 4 months after amputation surgery. However, the patients presented an improvement in cognition when compared to the results before surgery. The authors suggested that this improvement was associated with the perceived increase in general health [31]. Another study with patients amputated due to peripheral vascular disease demonstrated that they performed significantly worse than controls in certain measures of psychomotor speed and problem-solving or abstract reasoning. The authors hypothesized that cognitive deficits may be the result of unrecognized concomitant cerebrovascular diseases, which are part of a generalized pattern of vascular disease [32].

In a study conducted by Gardner et al. [28], patients with PAD were grouped according to their performance on a mini-mental state examination (MMSE). Patients who scored at least 28 out of 30 points on MMSE underwent an assessment of several aspects, including peak walking time and health-related quality of life. The group with lower MMSE scores had a lower education level, a greater prevalence of coronary artery disease, chronic obstructive pulmonary disease, and arthritis, and took more medications for diabetes. The mean peak walking time was significantly reduced in the group with lower MMSE scores compared to the group with higher MMSE scores. The group with lower MMSE scores perceived less ability to perform the high-intensity exercise of climbing stairs, and they had lower levels of health-related quality of life (Table 1).

Table 1: Cognitive function in PAD patients

Reference	Study sample	Total sample size and Sex	Mean age	Cognitive measures	Cognitive results
Phillips <i>et al.</i> , 1993 (Arch Phys Med Rehabil)	Patients with lower-extremity amputations secondary to PAD and healthy volunteers	37: PAD group (4 women and 10 men) and healthy volunteers (9 women and 5 men)	67.4±14.8 and 69.9±9.3	Learning and memory (WAIS-R. Digit Symbol subtest, WMS-R); language and verbal ability; visuospatial organization and constructional abilities; problem solving (MCST); abstract reasoning and concept formation; social judgement and sequential reasoning; psychomotor function.	The PAD amputee patients performed more poorly than controls ($p < .002$, one-tailed) on the WAIS-R. Digit Symbol subtest and obtained fewer categories on the MSCT than did the controls. There were trends ($p < .01$, one-tailed) toward lower patient scores on a number of other neuropsychological tests including the WAIS-R. Vocabulary, Arithmetic, Similarities, and picture arrangement subtests, oral fluency (COWAT, orthographic condition), and the copy administration of the ROCF.
Waldstein <i>et al.</i> , 2003 (Psychosomatic Medicine)	PAD, stroke, hypertensive and normotensive patients	107: Normotensive group (7 women and 16 men), hypertensive group (5 women and 15 men), PAD group (10 women and 28 men) and stroke group (6 women and 20 men)	66.3±5.8 70.0±5.7 69.8±7.0 62.3±8.1	Tests for verbal memory (WMS-R) non verbal memory attention, was evaluated by recall of geometric figures using the Visual Reproductions subscale of the WMS-R. Trail Making Test Parts A and B and the Stroop Color-Word Test for perceptuomotor speed and executive functions: Motor speed and manual dexterity were examined with the Grooved Pegboard test.	PAD patients performed more poorly than normotensive patients in tests of non verbal memory, verbal working memory ($p < .002$), perceptuomotor speed, attention and mental flexibility and motor speed and manual dexterity ($p < .00001$) and compared to hypertensive patients in verbal memory ($p < .002$), verbal working memory perceptuomotor speed, attention and mental flexibility. Stroke-PAD-Hypertensive-Normotensive
Mangiafico <i>et al.</i> , 2006 (Age and Ageing)	Asymptomatic (APAD) - stage I PAD	328: APAD group (42 women and 122 men) and Control group (44 women and 120 men)	70.0±3.4 and 70.3 ± 3.7	Cognitive domains of attention and verbal working memory (Digit Span Forward and Backward), perceptuomotor speed, attention and mental flexibility (Trail Making Test), visuoconstructive skills and visual memory (ROCF Copy and ROCF Delayed Recall and the global cognitive functioning (MMSE).	Patients with APAD scored significantly worse ($p < .00001$) than control subjects on five cognitive tests: Digit Span Backward, Trail Making A, Trail Making B, ROCF Copy and ROCF Delayed Recall
Williams <i>et al.</i> , 2014 (Arch Phys Med Rehab.)	PAD or DM patients with lower extremity amputation.	87: Presurgically (1 woman and 28 men) and postsurgically (6 women and 52 men)	63±10 and 62±8	Neuropsychological Test: Score: executive function (semantic fluency), auditory-verbal learning (list learning), and verbal memory (list recall)	Improvement in overall performance between presurgery and 6 weeks ($p = .03$) and presurgery and 4 months ($p = .06$), but no differences between 6 weeks and 4 months after amputation.
Gardner <i>et al.</i> , 2016 (Journal of Vascular Surgery)	Symptomatic PAD: Patients with a perfect MMSE score of 30 points and patients with score <30 points.	246: PAD patients with score of 30 (65 women and 58 men) and PAD patients with score <30 (61 women and 62 men)	64±10 and 65±11	MMSE questionnaire	Lower cognitive screening scores were associated with greater ambulatory impairment. Worse cognitive status was associated with lower scores in multiple dimensions of health-related QoL. The group with lower MMSE scores had a lower education level ($p < .01$), a greater prevalence of CAD ($p = .02$), COPD ($p = .01$), and arthritis ($p < .01$), and took more medications for diabetes ($p < .01$)
Cavalcante <i>et al.</i> , 2018 (Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.)	Symptomatic PAD (intermittent claudication in one or two legs, stage)	130: 29 women and 101 men	67±8	Cognitive function: global, memory, executive function and attention by MoCA test	86% of patients were classified as probably having a cognitive impairment. Greater memory performance was associated with greater moderate to vigorous physical activity levels ($p = 0.044$) and walking capacity ($p = 0.033$)

CAD: coronary artery disease; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; COWAT: Controlled Oral Word Association Test; DM: diabetes mellitus; MMSE: mini-mental state examination questionnaire; MoCA: Montreal cognitive assessment; PAD: peripheral arterial disease; QoL: health-related quality of life; ROCF: Rey-Osterneth Complex Figure SPMSQ: short portable mental status questionnaire; WAIS-R: Wechsler Adult Intelligence Scale-Revised; WMS-R: Wechsler Memory Scale-Revised.

2.2. The Ankle-Brachial Index as an Indicator of Cognitive Dysfunction in PAD

The ankle-brachial index (ABI) is very useful in the evaluation of patients with suspected PAD. The test is based on the systolic pressure measurement from the posterior tibial arteries and dorsalis pedis of each leg, normalized by the highest brachial pressure of each arm to assess the ankle-brachial index. The typical cutoff point for diagnosing PAD is ≤ 0.90 at rest [4]. According to Hart et al., the ABI was significantly correlated with intramuscular inflammation, oxidative stress, and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation [33].

Interestingly, in a cohort study [34], 717 men and women (aged 55 to 74) from the general population were followed for 10 years. The results indicated that the lower the ABI, the worse the performances in nonverbal reasoning, verbal fluency, and information processing speed. These data strongly support that ABI is predictive for cognitive impairment. Accordingly, a relationship between ABI and cognitive function was found in a cross-sectional survey in elderly Chinese people, after logistic regression and adjustment for age and sex. The presence of cardiovascular diseases (stroke, hypertension, myocardial infarction) and cognitive impairment was positively associated with low ABI [35]. Finally, Espeland et al. demonstrated that in an older cohort of non-demented sedentary individuals, lower ABI was independently correlated with cognitive function and associated with greater 2-year risk for progression to mild cognitive impairment or probable dementia [36]. This association between ABI and cognitive impairment was confirmed in a cross-sectional study where aging resulted in a higher proportion of individuals with low ABI or cognitive impairment [37]. Further, individuals with low ABI had a higher frequency of cerebral lacunar infarcts, intracranial stenosis, cortical thinning, and lower verbal memory performance [38]. In a systematic review and meta-analysis, ABI proved to be an accessible tool for patients with stroke, demonstrating an association between low ABI (≤ 0.9) and recurrent stroke and future vascular events [39]. Thus, originally proposed for the noninvasive diagnosis of PAD, ABI might be a simple measure to assess whether PAD patients would be more likely to develop cognitive impairments. Together, these results suggest that ABI is an indicator not only of PAD, but also of cognitive function (Figure 2) and ABI determination might further support exercise as a therapeutic approach.

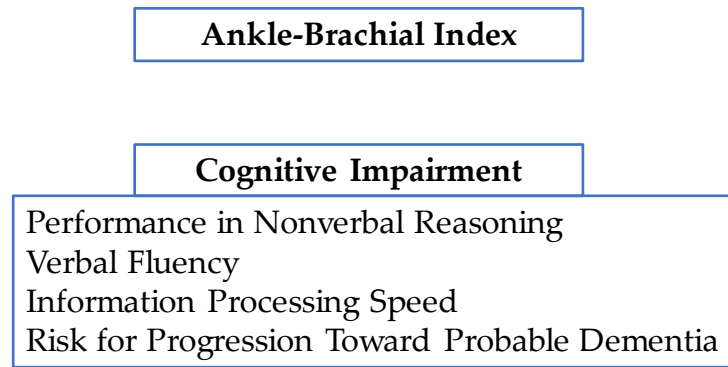


Figure 2. Ankle-brachial index is an indicator not only for PAD, but also for cognitive dysfunction.

3. Implications of Myokines in the Beneficial Effects of Exercise on Brain Function in Peripheral Arterial Disease Patients

The regular practice of physical exercise is one of the most effective treatments for patients with intermittent claudication [40]. Physical exercise is a good and low-cost non-pharmacological therapeutic strategy, minimizing the effects of ischemia-reperfusion injury and improving the clinical and mental state of the patients. Among the positive effects of physical exercise are the reduction of inflammatory factors and oxidative stress, increased angiogenesis, and improvement of endothelial and cognitive function. According to Cavalcante et al. [29], cognitive performance in patients with PAD is positively associated with walking ability and moderate to vigorous intensity physical activity.

Skeletal muscle accounts for approximately 40% of the total body mass and evidence indicates that, besides its locomotor function, skeletal muscle secretes cytokines or other peptides that may exert paracrine, or endocrine effects in distant organs [41–43]. Such myokine secretion is generally enhanced by exercise and they may play important anti-inflammatory, neuroprotective and neurogenic roles [43–45]. Additionally, a preferential shift toward a microglial anti-inflammatory phenotype likely participates in exercise-induced protection of the cognitive function in PAD patients.

3.1. Involvement of Myokines in Exercise-Induced Protection of the Cognitive Function

Studies have shown that anti-inflammatory cytokines, such as IL-6, IL-1RA, and IL-10, are increased after exercise. Physical exercise also induces the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in the hippocampus, an important factor responsible for neuron survival, maturation, proliferation, and plasticity, thus playing a significant role in learning and memory [46,47].

Moon et al. [48] suggested that cathepsin-B may be an important mediator of the effects of physical exercise on cognition. After 12 weeks of exercise, cathepsin-B levels increased in mice plasma and muscle, and the cathepsin-B treatment in neuronal cells increased BDNF expression. Further, cathepsin-B knockout mice showed no improvement in neurogenesis and spatial memory, as compared to control mice. Importantly, similar results were found in rhesus monkey and humans, correlating the increase of cathepsin-B plasma levels with cognition improvement [48].

Irisin appears also as an exercise-induced myokine, released upon the cleavage of the membrane-bound precursor protein fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5). It is associated with homeostasis processes such as glucose metabolism, insulin sensitivity, and fat browning [49]. Recently, irisin demonstrated an important role as a neurotrophic factor promoting survival, maintenance, and function of neuronal cells [50]. Wang et al. [51], showed that irisin protected the neurons, reduced the release of IL-1 β and IL-6, and reduced the expression of cyclooxygenase 2 (proinflammatory factor) in cultured astrocytes exposed to β -amyloid. Accordingly, Lourenço et al. [52] showed that an intra-cerebroventricular infusion of amyloid- β oligomers (A β Os) induced

significant reductions of FNDC5 mRNA expression in mice hippocampus. Similarly, impaired maintenance of hippocampal long-term potentiation and memory were observed in knocked down FNDC5/irisin mice. However, when A β O mice received an intravenous injection of FNDC5, hippocampus FNDC5 levels increased and memory was protected. Reduced levels of FNDC5/irisin in the brain and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease further support the implication of such defective signaling in humans.

Concerning exercise/irisin relationships, some controversies still exist. Physical exercise protected A β O mice from cognitive dysfunction and increased the hippocampal levels of FNDC5/irisin, as compared to sedentary mice [52]. Consistently, mice performing physical exercise for 2 weeks prior to cerebral ischemia demonstrated better scores on a neurological function test. Further supporting the neuroprotective effects of irisin, such beneficial effects of physical exercise were abolished when blocking irisin one hour before cerebral ischemia [53].

However, since the original study by Bostrom et al. showing that exercise increases irisin in mice and humans [54], others proposed negative evidence of a possible expression and concentrations of irisin in skeletal muscles and serum during exercise or training [55,56] and the physiological role of FNDC5/irisin in mediating responses to exercise was challenged [57]. Nonetheless, several publications supported exercise-related changes in irisin [58]. For example, an exercise-related increase in irisin resulted in BDNF expression in the hippocampus [59] and Küster et al. [60] observed a positive correlation between irisin, BDNF levels, and cognition in older adults at risk of dementia after 10 weeks of physical exercise. Accordingly, physical exercise-induced cognitive improvement together with increased neurogenesis and BDNF, FNDC5 levels, and synaptic proteins in the hippocampus of 5XFAD transgenic mice, a model for Alzheimer's disease [61]. It is therefore likely that the high expression of the irisin precursor FNDC5 in the *brain, including in the cerebellar Purkinje cells, the hypothalamus and hippocampus might participate in the beneficial effects of exercise on brain and neurodegenerative diseases* [62].

The type of exercise might modulate irisin /brain interactions. Irisin appeared to not be involved in resistance training because it failed to activate PGC-1 α 1, a transcription regulator upstream of the FNDC5 [62]. The timing of blood withdrawal might also be essential since elevated irisin has been shown to be transient during exercise in young men and women [63]. This might also explain some discrepant data previously reported [53–63]. Ongoing identification of irisin receptors and detailed signaling pathways triggered during exercise will be useful to increase our knowledge and allow us to optimize irisin activity modulation.

Interleukin 6 (IL-6) has been described as a double-edged sword, which may present pro- or anti-inflammatory effects, and consequently neurodegenerative or protective actions [64,65]. Mainly defined as a proinflammatory cytokine, IL-6 was the first myokine found to be secreted into the bloodstream in response to muscle contractions, with a considerable increase in plasma up to 100-fold in response to exercise [66,67].

The role of IL-6 in the brain is rather complex. IL-6 differentially influences microglia, mediating neuroprotective [68] and neurotoxic microglial responses [69]. It exerts neurotrophic actions and is also a mediator of acute inflammation [70]. A number of studies have reported elevated levels of IL-6 during central nervous system (CNS) disorders [65], but on the other hand Ma and co-workers [71], demonstrated that IL-6 reduced neuronal cytosolic Ca²⁺ overload, mitochondrial membrane depolarization, and neuronal induced by NMDA, demonstrating that IL-6 has a neuroprotective property. Similarly, the IFN- γ and IL-6 in an acute neuro-inflammatory environment are neuroprotective via ERK and/or STAT3 [72]. Gmiat et al. found that a single bout of high-intensity circuit training was able to improve concentration and spatial memory in young women, and that irisin and IL-6 releases from exercise (respecting intensity and periods of adequate rest and nutrition) might be considered as a sensor stimulating BDNF synthesis [73]. Starkie et al. demonstrated that

exercise and IL-6 infusion inhibit TNF- α production, suggesting that IL-6 might mediate anti-inflammatory activity during exercise [74].

Myostatin, another important myokine, is a member of the TGF- β superfamily, and its inactivation induces skeletal muscle hypertrophy in mice and humans. Myostatin also regulates the maintenance of metabolic homeostasis and modulation of adipose tissue function and mass [75–77]. Myostatin could be expressed in different brain regions, but its function in the brain is still unknown [75]. Interestingly, Lin et al. [78] demonstrated that myostatin levels were elevated in the gastrocnemius muscle and that the extent of muscle mass loss was associated with the severity of cognitive deficits in transgenic mice mimicking Alzheimer's disease. Myostatin knockdown in the gastrocnemius increased grip strength and muscle mass and improved memory in such transgenic mice. The authors concluded that cognitive dysfunction may be mediated or triggered by myostatin expression and suggested that myokine modulation may be a therapeutic intervention against muscular and cerebral dysfunctions (Figure 3).

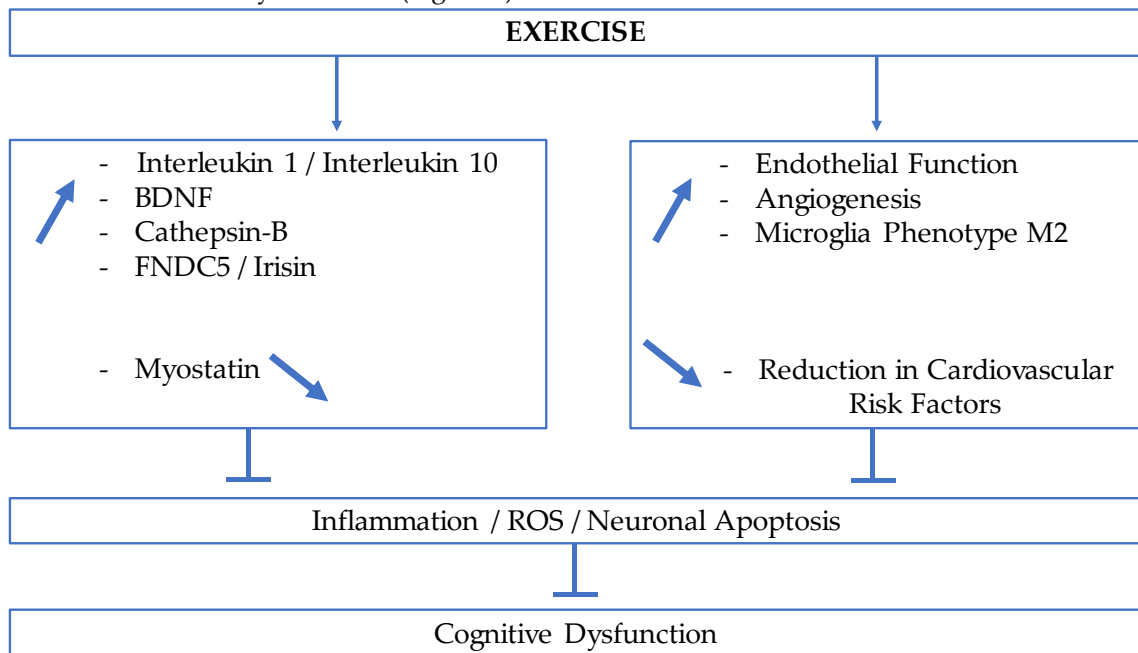


Figure 3. Mechanisms likely involved in exercise-related brain protection in PAD patients. BDNF Brain-derived neurotrophic factor; FNDC5: protein fibronectin type III domain-containing protein 5; ROS: Reactive oxygen species.

3.2. Microglial Anti-Inflammatory Phenotype and Exercise

Recently, another topic has been attracting interest in the scientific community. It is the study of the microglial anti-inflammatory phenotype. Microglia is a highly plastic group of immune cells that reside in the CNS. The classic microglia activation is pro-inflammatory, characterized by the release of TNF- α and IL-1 β , inducing neuro-inflammation and reduction in hippocampal neurogenesis [79–81]. However, some studies suggest that microglia is also capable of repairing tissue damage by producing anti-inflammatory cytokines, such as TGF- β ; growth factors, such as IGF-1 and BDNF [81]. The biphasic pro or anti-inflammatory role of microglia is dictated by the type of expressed phenotype. During the pro-inflammatory response, microglia expresses the M1 phenotype, while in the anti-inflammatory response the M2 phenotype is expressed. This biphasic response of microglia is linked to other cerebral cells, including astrocytes, oligodendrocytes, and neurons [82].

Beneficial effects of voluntary running in aged mice were related to the induction of a neuroprotective phenotype in microglia; and the proportion of BDNF positively co-labeled with microglia was correlated with the number of neurons [83]. Similar results were found by Kohman et al. [84], demonstrating that running increased the proportion of microglia expressing IGF-1 and the survival of neurons, suggesting that exercise shifts toward microglia pro-neurogenic phenotype allowing neuroprotection. Further, in a chronic cerebral hypoperfusion model, 28 days of exercise transformed the microglial phenotype from M1 to M2, improving the cognitive function in rats [85]. Further supporting the beneficial effect of exercise on microglia, a recent study showed that 4 weeks of physical exercise reduced the M1 phenotypic markers (CD32, CD86, and iNOS) and increased the M2 phenotypic markers (ARG1, TGF- β , and CD206) in the hippocampal microglia of an Alzheimer's disease model. This was accompanied by a reduction in inflammatory factors, such as IL-1 β and TNF- α , and by an increase in anti-inflammatory factors, such as IL-4 and IL-10. In addition, exercise reduced neuronal loss, oxidative stress, apoptosis, and pro-apoptotic cascade in the hippocampus. Exercise also improved the cognition, as inferred by better scores in three different tasks (Barnes maze task, passive avoidance test, and novel object recognition test) [86]. Similarly, intravenous administration of irisin 30 min after cerebral ischemia inhibited the activation of microglia, oxidative stress, and neuroinflammation in mice [53]. Finally, environmental enrichment with toys, tunnels, and running wheels, allowed the analysis of the importance of microglia in the neurogenesis of adult hippocampus. The activation of microglia was associated with hippocampal neurogenesis after 6 weeks of environmental enrichment [87]. Taken together, these studies suggest that physical exercise might modulate the activation of microglia with a protective impact on neurogenesis.

4. Exercise characteristics and improvement in cognitive function

Which kind of exercise might be the most beneficial in order to improve the cognitive function remains to be investigated in PAD. The effects of exercise training on intermittent claudication have been recently reviewed and, clearly, physical exercise either supervised and/or home-based improved PAD patient performance and quality of life. Several types of exercise were beneficial but exercising 3-5 times a week for 30–50 min was often used and demonstrated increased walking time without pain and increased exercise capacity [88,89]. In a study including 114 PAD patients, 3 types of physical exercise, supervised physical exercise, "home-based", and resistance programs, performed 3 times a week for 12 weeks were investigated. Even home-based exercise training improved circulating markers of antioxidant capacity, angiogenesis (VEGF), endothelium-derived inflammation (E-selectin), and blood glucose concentration [90]. Regarding intensity, a body of evidence suggests that higher exercise intensities may maximize the health outcomes of PAD patients [91]. Accordingly, a systematic review and meta-analysis supported that patients with PAD tolerated vigorous exercise intensity and intermittent aerobic exercise, the intensity being based on the occurrence of claudicating pain. Exercise duration of 24 weeks generated positive effects, the better exercise-induced responses being obtained in patients with mild pain [92].

Thus, one might propose that exercise protocols that are effective on PAD symptoms should also be effective on cerebral functions, following a dose–response relationship. Indeed, in patients with known cardiovascular diseases such as heart failure and stroke, the degree of improvement in cognitive performance was related to exercise duration, frequency, and intensity. Further, combined interventions might be more efficient than endurance and resistance training alone [93].

Interestingly, although irisin increased similarly in young men and women during exercise [63], we are not aware of studies investigating specifically potential gender differences in the relationship between PAD, exercise, and cognitive function. Nevertheless, a recent work stressed the role of gender in memory function, suggesting that exercise protocol should be further personalized [94].

5. Conclusion

In conclusion, PAD and ischemia-reperfusion damage are not restricted to the lower limbs, and significant deleterious effects can be observed in the brain. Particularly, PAD patients often present with cognitive dysfunctions, related to their PAD degree as inferred from the relationship between the ankle brachial index and the cognition level. The mechanisms and pathways that link the periphery and the CNS are still under investigation, but oxidative stress and inflammation appear to play key roles.

Physical exercise can already be considered as an efficient therapeutic option, reducing PAD-related cognitive dysfunctions, potentially through exercise-induced myokine secretion and microglial anti-inflammatory phenotype enhancement. Reduction in cardiovascular risk factor, improved endothelial function, decreased inflammation and oxidative stress should also participate in the beneficial effects of exercise in patients suffering from PAD.

Author Contributions: conceptualization, M.L.; A.L.C.; A.L.; M.P.; A.M.; V.E.; E.T.; E.A. and B.G.; methodology, M.L.; A.L.C.; A.L.; M.P.; A.M.; and V.E.; validation, M.L.; A.L.C.; A.L.; M.P.; A.M.; V.E.; E.T.; E.A. and B.G.; investigation, M.L.; writing—original draft preparation, M.L.; A.L.C.; V.E. and B.G.; writing—review and editing, M.L.; V.E.; E.T.; E.A.; and B.G.; supervision, V.E.; E.T.; E.A.; and B.G.; funding acquisition, M.L.

Funding: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES).

Acknowledgments: We are grateful to Anne-Marie Kasprovicz for expert secretarial assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ramos, R.; Quesada, M.; Solanas, P.; Subirana, I.; Sala, J.; Vila, J.; Masiá, R.; Cerezo, C.; Elosua, R.; Grau, M.; et al. Prevalence of symptomatic and asymptomatic peripheral arterial disease and the value of the ankle-brachial index to stratify cardiovascular risk. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2009**, *3*, 305–311.
2. Alzamora, M.T.; Forés, R.; Baena-Díez, J.M.; Pera, G.; Toran, P.; Sorribes, M.; Vicheto, M.; Reina, M.D.; Sancho, A.; Albaladejo, C.; et al. The peripheral arterial disease study (PERART/ARTPER): Prevalence and risk factors in the general population. *BMC Public Health* **2010**, *10*, 38.
3. Felix-Redondo, F.J.; Fernandez-Berges, D.; Grau, M.; Baena-Diez, J.M.; Mostaza, J.M.; Vila, J. Prevalence and clinical characteristics of peripheral arterial disease in the study population Hermex. *Rev. Esp. Cardiol.* **2012**, *65*, 726–733.
4. Aboyans, V.; Ricco, J.B.; Bartelink, M.E.L.; Björck, M.; Brodmann, M.; Cohnert, T.; Collet, J.P.; Czerny, M.; De Carlo, M.; Debus, S.; et al. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: The European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *Eur. Heart J.* **2018**, *39*, 763–816.
5. Norgren, L.; Hiatt, W.R.; Dormandy, J.A.; Nehler, M.R.; Harris, K.A.; Fowkes, F.G.; TASC II Working Group; Bell, K.; Caporusso, J., Durand-Zaleski, I.; et al. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2007**, *33*, S1–S75.
6. Reeve, T.E.; Ur, R.; Craven, T.E.; Kaan, J.H.; Goldman, M.P.; Edwards, M.S.; Hurie, J.B.; Velazquez-Ramirez, G.; Corriere, M.A. Grip strength measurement for frailty assessment in patients with vascular disease and associations with comorbidity, cardiac risk, and sarcopenia. *J. Vasc. Surg.* **2018**, *67*, 1512–1520.
7. Ratliff, D.A.; Puttick, M.; Libertiny, G.; Hicks, R.C.J.; Earby, L.E.; Richards, T. Supervised exercise training for intermittent claudication: Lasting benefit at three years. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2007**, *34*, 322–326.
8. Fakhry, F.; van de Luijngaarden, K.M.; Bax, L.; den Hoed, P.T.; Hunink, M.G.M.; Rouwet, E.V.; Spronk, S. Supervised walking therapy in patients with intermittent claudication. *J. Vasc. Surg.* **2012**, *56*, 1132–1142.

9. Sakamoto, S.; Yokoyama, N.; Tamori, Y.; Akutsu, K.; Hashimoto, H.; Takeshita, S. Patients with peripheral artery disease who complete 12-week supervised exercise training program show reduced cardiovascular mortality and morbidity. *Circ. J.* **2009**, *73*, 167–173.
10. Chang, P.; Nead, K.T.; Olin, J.W.; Myers, J.; Cooke, J.P.; Leeper, N.J. Effect of physical activity assessment on prognostication for peripheral artery disease and mortality. *Mayo Clin. Proc.* **2015**, *90*, 339–345.
11. Joseph, A.-M.; Adhietty, P.J.; Leeuwenburgh, C. Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* **2016**, *594*, 5105–5123.
12. Lejay, A.; Laverny, G.; Paradis, S.; Schlagowski, A.I.; Charles, A.L.; Singh, F.; Zoll, J.; Thaveau, F.; Lonsdorfer, E.; Dufour, S.; et al. Moderate Exercise Allows for shorter Recovery Time in Critical Limb Ischemia. *Front Physiol.* **2017**, *8*, 523.
13. Muller, M.D.; Reed, A.B.; Leuenberger, U.A.; Sinoway, L.I. Physiology in Medicine : Peripheral arterial disease. *J. Appl. Physiol.* **2013**, *115*, 1219–1226.
14. Hung, C.L.; Tseng, J.W.; Chao, H.H.; Hung, T.M.; Wang, H.S. Effect of Acute Exercise Mode on Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and Task Switching Performance. *J. Clin. Med.* **2018**, doi: 10.3390/jcm7100301.
15. Törpel, A.; Herold, F.; Hamacher, D.; Müller, N.G.; Schega, L. Strengthening the Brain-Is Resistance Training with Blood Flow Restriction an Effective Strategy for Cognitive Improvement? *J. Clin. Med.* **2018**, doi: 10.3390/jcm7100337.
16. Zhang, L.; Chopp, M.; Zhang, Y.; Xiong, Y.; Li, C.; Sadry, N.; Rhaleb, I.; Lu, M.; Zhang, Z.G. Diabetes Mellitus Impairs Cognitive Function in Middle-Aged Rats and Neurological Recovery in Middle-Aged Rats After Stroke. *Stroke* **2016**, *47*, 2112–2118.
17. Moheet, A.; Mangia, S.; Seaquist, E.R. Impact of diabetes on cognitive function and brain structure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2015**, *1353*, 60–71.
18. Moonga, I.; Niccolini, F.; Wilson, H.; Pagano, G.; Politis, M. Hypertension is associated with worse cognitive function and hippocampal hypometabolism in Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* **2017**, *24*, 1173–1182.
19. Dik, M.G.; Jonker, C.; Comijs, H.C.; Deeg, D.J.; Kok, A.; Yaffe, K.; Penninx, B.W. Contribution of metabolic syndrome components to cognition in older individuals. *Diabetes Care.* **2007**, *30*, 2655–2660.
20. Snyder, H.M.; Corriveau, R.A.; Craft, S.; Faber, J.E.; Greenberg, S.M.; Knopman, D.; Lamb, B.T.; Montine, T.J.; Nedergaard, M.; Schaffer, C.B.; et al. Vascular contributions to cognitive impairment and dementia including Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2015**, *11*, 710–717.
21. Leardini-Tristão, M.; Borges, J.P.; Freitas, F.; Rangel, R.; Daliry, A.; Tibiriçá, E.; Estado, V. The impact of early aerobic exercise on brain microvascular alterations induced by cerebral hypoperfusion. *Brain Res.* **2017**, *1657*, 43–51.
22. Obadia, N.; Lessa, M.A.; Daliry, A.; Silveiras, R.R.; Gomes, F.; Tibiriçá, E.; Estado, V. Cerebral microvascular dysfunction in metabolic syndrome is exacerbated by ischemia-reperfusion injury. *BMC Neurosci.* **2017**, *18*, 67.
23. Guillot, M.; Charles, A.L.; Chamaroux-Tran, T.N.; Bouitbir, J.; Meyer, A.; Zoll, J.; Schneider, F.; Geny, B. Oxidative stress precedes skeletal muscle mitochondrial dysfunction during experimental aortic cross-clamping but is not associated with early lung, heart, brain, liver, or kidney mitochondrial impairment. *J. Vasc. Surg.* **2014**, *60*, 1043–1051.
24. Karimi, N.; Haghani, M.; Noorafshan, A.; Moosavi, S.M.S. Structural and functional disorders of hippocampus following ischemia/reperfusion in lower limbs and kidneys. *Neuroscience* **2017**, *358*, 238–248.
25. Chen, Y.; Zhou, J.; Li, J.; Yang, S.B.; Mo, L.Q.; Hu, J.H.; Yuan, W.L. Electroacupuncture pretreatment prevents cognitive impairment induced by limb ischemia-reperfusion via inhibition of microglial activation and attenuation of oxidative stress in rats. *Brain Res.* **2012**, *1432*, 36–45.
26. Rafnsson, S.B.; Deary, I.J.; Fowkes, F.G. Peripheral arterial disease and cognitive function. *Vasc. Med.* **2009**, *14*, 51–61.
27. Waldstein, S.R.; Tankard, C.F.; Maier, K.J.; Pelletier, J.R.; Snow, J.; Gardner, A.W.; Macko, R.; Katznel, L.I. Peripheral arterial disease and cognitive function. *Psychosom. Med.* **2003**, *65*, 757–763.

28. Gardner, A.W.; Waldstein, S.R.; Montgomery, P.S.; Zhao, Y.D. Effect of cognitive status on exercise performance and quality of life in patients with symptomatic peripheral artery disease. *J. Vasc. Surg.* **2016**, *63*, 98–104.
29. Cavalcante, B.R.; Germano-Soares, A.H.; Gerage, A.M.; Leicht, A.; Tassitano, R.M.; Bortolotti, H.; de Mello Franco, F.G.; Woloske, N.; Cucato, G.G.; Ritti-Dias, R.M. Association between physical activity and walking capacity with cognitive function in peripheral artery disease patients. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **2018**, *55*, 672–678.
30. Mangiafico, R.A.; Sarnataro, F.; Mangiafico, M.; Fiore, C.E. Impaired cognitive performance in asymptomatic peripheral arterial disease: relation to C-reactive protein and D-dimer levels. *Age Ageing* **2006**, *35*, 60–65.
31. Williams, R.M.; Turner, A.P.; Green, M.; Norvell, D.C.; Henderson, A.W.; Hakimi, K.N.; Blake, D.J.; Czerniecki, J.M. Changes in cognitive function from presurgery to 4 months postsurgery in individuals undergoing dysvascular amputation. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **2014**, *95*, 663–669.
32. Phillips, N.A.; Mate-Kole, C.C.; Kirby, R.L. Neuropsychological function in peripheral vascular disease amputee patients. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* **1993**, *74*, 1309–1314.
33. Hart, C.R.; Layec, G.; Trinity, J.D.; Kwon, O.S.; Zhao, J.; Reese, V.R.; Gifford, J.R.; Richardson, R.S. Increased skeletal muscle mitochondrial free radical production in peripheral arterial disease despite preserved mitochondrial respiratory capacity. *Exp. Physiol.* **2018**, *103*, 838–850.
34. Price, J.F.; McDowell, S.; Whiteman, M.C.; Deary, I.J.; Stewart, M.C.; Fowkes, F.G. Ankle brachial index as a predictor of cognitive impairment in the general population: ten-year follow-up of the Edinburgh Artery Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2006**, *54*, 763–769.
35. Woo, J.; Lynn, H.; Wong, S.Y.; Hong, A.; Tang, Y.N.; Lau, W.Y.; Lau, E.; Orwoll, E.; Kwok, T.C. Correlates for a low ankle-brachial index in elderly Chinese. *Atherosclerosis* **2006**, *186*, 360–366.
36. Espeland, M.A.; Newman, A.B.; Sink, K.; Gill, T.M.; King, A.C.; Miller, M.E.; Guralnik, J.; Katula, J.; Church, T.; Manini, T.; et al. Associations Between Ankle-Brachial Index and Cognitive Function: Results From the Lifestyle Interventions and Independence for Elders Trial. *J. Am. Med. Assoc.* **2015**, *313*, 682–689.
37. Wang, A.; Jiang, R.; Su, Z.; Jia, J.; Zhang, N.; Wu, J.; Chen, S.; Zhao, X. A low ankle-brachial index is associated with cognitive impairment: The APAC study. *Atherosclerosis* **2016**, *255*, 90–95.
38. Shaik, M.A.; Venketasubramanian, N.; Cheng, C.Y.; Wong, T.Y.; Vrooman, H.; Ikram, M.K.; Hilal, S.; Chen, C. Ankle brachial index, MRI markers and cognition: The Epidemiology of Dementia in Singapore study. *Atherosclerosis* **2017**, *263*, 272–277.
39. Hong, J.B.; Leonards, C.O.; Endres, M.; Siegerink, B.; Liman, T.G. Ankle-Brachial Index and Recurrent Stroke Risk: Meta-Analysis. *Stroke* **2016**, *47*, 317–322.
40. Stewart, K.J.; Hiatt, W.R.; Regensteiner, J.G.; Hirsch, A.T. Exercise training for claudication. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *347*, 1941–1951.
41. Janssen, I.; Heymsfield, S.B.; Wang, Z.M.; Ross, R. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 yr. *J. Appl. Physiol.* **2000**, *89*, 81–88.
42. Pedersen, B.K.; Febbraio, M.A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2012**, *8*, 457–465.
43. Pedersen, B.K. Muscle as a secretory organ. *Compr. Physiol.* **2013**, *3*, 1337–1362.
44. Steensberg, A.; van Hall, G.; Osada, T.; Sacchetti, M.; Saltin, B.; Klarlund Pedersen, B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J. Physiol.* **2000**, *529*, 237–242.
45. Pedersen, B.K.; Akerstrom, T.C.; Nielsen, A.R.; Fischer, C.P. Role of myokines in exercise and metabolism. *J. Appl. Physiol.* **2007**, *103*, 1093–1098.
46. Cechetti, F.; Worm, P.V.; Elsner, V.R.; Bertoldi, K.; Sanches, E.; Ben, J.; Siqueira, I.R.; Netto, C.A. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2012**, *97*, 90–96.
47. Wang, S.; Chen, L.; Zhang, L.; Huang, C.; Xiu, Y.; Wang, F.; Zhou, C.; Luo, Y.; Xiao, Q.; Tang, Y. Effects of long-term exercise on spatial learning, memory ability, and cortical capillaries in aged rats. *Med. Sci. Monit.* **2015**, *21*, 945–954.

48. Moon, H.Y.; Becke, A.; Berron, D.; Becker, B.; Sah, N.; Benoni, G.; Janke, E.; Lubejko, S.T.; Greig, N.H.; Mattison, J.A.; et al. Running-Induced Systemic Cathepsin B Secretion Is Associated with Memory Function. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 332–340.
49. Kim, O.Y.; Song, J. The Role of Irisin in Alzheimer's Disease. *J. Clin. Med.* **2018**, doi: 10.3390/jcm7110407.
50. Zhang, J.; Zhang, W. Can irisin be a linker between physical activity and brain function? *Biomol. Concepts* **2016**, *7*, 253–258.
51. Wang, K.; Li, H.; Wang, H.; Wang, J.H.; Song, F.; Sun, Y. Irisin Exerts Neuroprotective Effects on Cultured Neurons by Regulating Astrocytes. *Mediators Inflamm.* **2018**, *2018*, 9070341.
52. Lourenco, M.V.; Frozza, R.L.; de Freitas, G.B.; Zhang, H.; Kincheski, G.C.; Ribeiro, F.C.; Gonçalves, R.A.; Clarke, J.R.; Beckman, D.; Staniszewski, A. et al. Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 165–175.
53. Li, D.J.; Li, Y.H.; Yuan, H.B.; Qu, L.F.; Wang, P. The novel exercise-induced hormone irisin protects against neuronal injury via activation of the Akt and ERK1/2 signaling pathways and contributes to the neuroprotection of physical exercise in cerebral ischemia. *Metabolism* **2017**, *68*, 31–42.
54. Boström, P.; Wu, J.; Jedrychowski, M.P.; Korde, A.; Ye, L.; Lo, J.C.; Rasbach, K.A.; Boström, E.A.; Choi, J.H.; Long, J.Z.; et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **2012**, *481*, 463–468.
55. Pekkala, S.; Wiklund, P.K.; Hulmi, J.J.; Ahtiainen, J.P.; Horttanainen, M.; Pöllänen, E.; Mäkelä, K.A.; Kainulainen, H.; Häkkinen, K.; Nyman, K.; et al. Are skeletal muscle FNDC5 gene expression and irisin release regulated by exercise and related to health? *J. Physiol.* **2013**, *591*, 5393–5400.
56. Kurdiová, T.; Balaz, M.; Vician, M.; Maderova, D.; Vlcek, M.; Valkovic, L.; Srbecky, M.; Imrich, R.; Kyselovicova, O.; Belan, V.; et al. Effects of obesity, diabetes and exercise on *Fndc5* gene expression and irisin release in human skeletal muscle and adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *J. Physiol.* **2014**, *592*, 1091–1107.
57. Atherton, P.J.; Phillips, B.E. Greek goddess or Greek myth: the effects of exercise on irisin/FNDC5 in humans. *J. Physiol.* **2013**, *591*, 5267–5268.
58. Boström, P.A.; Fernández-Real, J.M.; Mantzoros, C. Irisin in humans: recent advances and questions for future research. *Metabolism* **2014**, *63*, 178–180.
59. Wrann, C.D.; White, J.P.; Salogiannis, J.; Laznik-Bogoslavski, D.; Wu, J.; Ma, D.; Lin, J.D.; Greenberg, M.E.; Spiegelman, B.M. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 pathway. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 649–659.
60. Küster, O.C.; Laptinskaya, D.; Fissler, P.; Schnack, C.; Zügel, M.; Nold, V.; Thurm, F.; Pleiner, S.; Karabatsiakos, A.; von Einem, B.; et al. Novel Blood-Based Biomarkers of Cognition, Stress, and Physical or Cognitive Training in Older Adults at Risk of Dementia: Preliminary Evidence for a Role of BDNF, Irisin, and the Kynurenine Pathway. *J. Alzheimers Dis.* **2017**, *59*, 1097–1111.
61. Choi, S.H.; Bylykbashi, E.; Chatila, Z.K.; Lee, S.W.; Pulli, B.; Clemenson, G.D.; Kim, E.; Rompala, A.; Oram, M.K.; Asselin, C.; et al. Combined adult neurogenesis and BDNF mimic exercise effects on cognition in an Alzheimer's mouse model. *Science* **2018**, doi: 10.1126/science.aan8821.
62. Young, M.F.; Valaris, S.; Wrann, C.D. A role for FNDC5/Irisin in the beneficial effects of exercise on the brain and in neurodegenerative diseases. Progress in cardiovascular diseases. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2019**, *62*, 172–178.
63. Kraemer, R.R.; Shockett, P.; Webb, N.D.; Shah, U.; Castracane, V.D. A transient elevated irisin blood concentration in response to prolonged, moderate aerobic exercise in young men and women. *Horm. Metab. Res.* **2014**, *46*, 150–154.
64. Munoz-Canoves, P.; Scheele, C.; Pedersen, B.K.; Serrano, A.L. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J.* **2013**, *280*, 4131–4148.
65. Gruol, D.L. IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. *Neuropharmacology.* **2015**, *96*, 42–54.
66. Pedersen, B.K.; Febbraio, M.A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* **2008**, *88*, 1379–1406.
67. Hirano, T. Interleukin 6 and its receptor: Ten years later. *Int. Rev. Immunol.* **1998**, *16*, 249–284.

68. Eskes, C.; Honegger, P.; Juillerat-Jeanneret, L.; Monnet-Tschudi, F. Microglial reaction induced by noncytotoxic methylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release. *Glia* **2002**, *37*, 43–52.
69. Krady, J.K.; Lin, H.W.; Liberto, C.M.; Basu, A.; Kremlev, S.G.; Levison, S.W. Ciliary neurotrophic factor and interleukin-6 differentially activate microglia. *J. Neurosci. Res.* **2008**, *86*, 1538–1547.
70. Spooren, A.; Kolmus, K.; Laureys, G.; Clinckers, R.; De Keyser, J.; Haegeman, G.; Gerlo, S. Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain Res. Rev.* **2011**, *67*, 157–183.
71. Ma, S.H.; Zhuang, Q.X.; Shen, W.X.; Peng, Y.P.; Qiu, Y.H. Interleukin-6 reduces NMDAR-mediated cytosolic Ca²⁺(+) overload and neuronal death via JAK/Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium*. **2015**, *58*, 286–295.
72. Sun, L.; Li, Y.; Jia, X.; Wang, Q.; Li, Y.; Hu, M.; Tian, L.; Yang, J.; Xing, W.; Zhang, W.; et al. Neuroprotection by IFN-gamma via astrocyte-secreted IL-6 in acute neuroinflammation. *Oncotarget* **2017**, *8*, 40065–40078.
73. Gmiat, A.; Micielska, K.; Kozłowska, M.; Flis, D.J.; Smaruj, M.; Kujach, S.; Jaworska, J.; Lipińska, P.; Ziemann, E. The impact of a single bout of high intensity circuit training on myokines' concentrations and cognitive functions in women of different age. *Physiol. Behav.* **2017**, *179*, 290–297.
74. Starkie, R.; Ostrowski, S.R.; Jauffred, S.; Febbraio, M.; Pedersen, B.K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *FASEB J.* **2003**, *17*, 884–886.
75. Rodgers, B.D.; Garikipati, D.K. Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: A comparative review. *Endocr. Rev.* **2008**, *29*, 513–534.
76. Feldman, B.J.; Streeper, R.S.; Farese, R.V. Jr.; Yamamoto, K.R. Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2006**, *103*, 15675–15680.
77. Guo, T.; Jou, W.; Chanturiya, T.; Portas, J.; Gavrilova, O.; McPherron, A.C. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One.* **2009**, *4*, e4937.
78. Lin, Y.S.; Lin, F.Y.; Hsiao, Y.H. Myostatin Is Associated With Cognitive Decline in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 1984–1991.
79. Monje, M.L.; Toda, H.; Palmer, T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* **2003**, *302*, 1760–1765.
80. Green, H.F.; Treacy, E.; Keohane, A.K.; Sullivan, A.M.; O'Keeffe, G.W.; Nolan, Y.M. A role for interleukin-1beta in determining the lineage fate of embryonic rat hippocampal neural precursor cells. *Mol. Cell Neurosci.* **2012**, *49*, 311–321.
81. Michelucci, A.; Heurtaux, T.; Grandbarbe, L.; Morga, E.; Heuschling, P. Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J. Neuroimmunol.* **2009**, *210*, 3–12.
82. Ma, Y.; Wang, J.; Wang, Y.; Yang, G.Y. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog. Neurobiol.* **2017**, *157*, 247–272.
83. Littlefield, A.M.; Setti, S.E.; Priester, C.; Kohman, R.A. Voluntary exercise attenuates LPS-induced reductions in neurogenesis and increases microglia expression of a proneurogenic phenotype in aged mice. *J. Neuroinflammation* **2015**, *12*, 138.
84. Kohman, R.A.; DeYoung, E.K.; Bhattacharya, T.K.; Peterson, L.N.; Rhodes, J.S. Wheel running attenuates microglia proliferation and increases expression of a proneurogenic phenotype in the hippocampus of aged mice. *Brain Behav. Immun.* **2012**, *26*, 803–810.
85. Jiang, T.; Zhang, L.; Pan, X.; Zheng, H.; Chen, X.; Li, L.; Luo, J.; Hu, X. Physical Exercise Improves Cognitive Function Together with Microglia Phenotype Modulation and Remyelination in Chronic Cerebral Hypoperfusion. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 404.
86. Lu, Y.; Dong, Y.; Tucker, D.; Wang, R.; Ahmed, M.E.; Brann, D.; Zhang, Q. Treadmill; Exercise Exerts Neuroprotection and Regulates Microglial Polarization and Oxidative Stress in a Streptozotocin-Induced Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2017**, *56*, 1469–1484.
87. Ziv, Y.; Ron, N.; Butovsky, O.; Landa, G.; Sudai, E.; Greenberg, N.; Cohen, H.; Kipnis, J.; Schwartz, M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 268–275.
88. McDermott, M.M. Exercise training for intermittent claudication. *J. Vasc. Surg.* **2017**, *66*, 1612–1620.

89. Golledge, J.; Singh, T.P.; Alahakoon, C.; Pinchbeck, J.; Yip, L.; Moxon, J.V.; Morris, D.R. Meta-analysis of clinical trials examining the benefit of structured home exercise in patients with peripheral artery disease. *Br. J. Surg.* **2019**, *106*, 319–331.
90. Gardner, A.W.; Parker, D.E.; Montgomery, P.S. Changes in vascular and inflammatory biomarkers after exercise rehabilitation in patients with symptomatic peripheral artery disease. *J. Vasc. Surg.* **2019**, doi: 10.1016/j.jvs.2018.12.056.
91. Ritti-Dias, R.M.; Correia, M.A.; Andrade-Lima, A.; Cucato, G.G. Exercise as a therapeutic approach to improve blood pressure in patients with peripheral arterial disease: current literature and future directions. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* **2018**, doi: 10.1080/14779072.2019.1553676.
92. Parmenter, B.J.; Dieberg, G.; Smart, N.A. Exercise training for management of peripheral arterial disease: A systematic review and meta-analysis. *Sports Med.* **2015**, *45*, 231–244.
93. Brunt, A.; Albines, D.; Hopkins-Rosseel, D. The Effectiveness of Exercise on Cognitive Performance in Individuals with Known Vascular Disease: A Systematic Review. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, doi: 10.3390/jcm8030294.
94. Loprinzi, P.D.; Frith, E. The Role of Sex in Memory Function: Considerations and Recommendations in the Context of Exercise. *J. Clin. Med.* **2018**, *7*, doi: 10.3390/jcm7060132.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).