



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

SANDRO DANIEL CÓRDOVA

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS AO MODELO
EXPERIMENTAL DE *STATUS EPILEPTICUS***

Porto Alegre, fevereiro de 2011

SANDRO DANIEL CÓRDOVA

**EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS EM RATOS JOVENS SUBMETIDOS AO MODELO
EXPERIMENTAL DE *STATUS EPILEPTICUS***

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas – Bioquímica,
como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas – Bioquímica.**

Orientador: Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre, 2011

"A auto-satisfação é inimiga do estudo. Se queremos realmente aprender alguma coisa, devemos começar por libertar-nos disso. Em relação a nós próprios devemos ser 'insaciáveis na aprendizagem' e em relação aos outros, 'insaciáveis no ensino'."

Mao Tse-Tung

À minha família

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e pelos inúmeros exemplos de honra e caráter, muito obrigado.

À Cris, minha companheira e incentivadora por todo o AMOR e companheirismo, além de exemplo de profissionalismo e dedicação, muito obrigado.

Aos meus irmãos, Sílvio e Francisco, pelos momentos de alegria, descontração e amizade, fundamentais durante toda a minha vida.

Ao meu orientador, Diogo Losch de Oliveira, pela orientação, paciência e dedicação, auxílios fundamentais para minha formação como pesquisador e como pessoa.

Ao Cássio, pelo auxílio nesta dissertação e pela amizade dentro e fora do laboratório.

Ao pessoal do laboratório, Mery, Bem Hur, Marcos, Marcela, Dênis, Eduardo Rico, e Kamil, e Luciana pelo auxílio profissional, convivência e companheirismo e conversas que tornaram este período tão agradável.

Ao professor Renato, por sua contribuição para tornar o momento do cafezinho uma oportunidade de aprendizado e reflexão.

Aos amigos de outros laboratórios, pelas boas conversas, conselhos e momentos de descontração.

SUMÁRIO

Parte I. Introdução.....	1
1.EPILEPSIAS	2
1.1.Epilepsia do lobo temporal.....	3
1.2.Status Epilepticus	4
2.ATIVIDADE FÍSICA.....	6
2.1.Exercício e cognição.....	6
2.2.Exercício voluntário e exercício forçado	8
2.3.Exercício e epilepsia.....	9
3.OBJETIVOS	12
3.1.Objetivo geral.....	12
3.2.Objetivos específicos	12
Parte II. RESULTADOS	13
Parte III. DISCUSSÃO.....	45
Parte IV. PERSPECTIVAS.....	50
Parte V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

RESUMO

O *status epilepticus* (SE) é uma convulsão com duração igual ou superior a 30 minutos ou diversas crises consecutivas sem que o indivíduo retome a consciência por igual período. O SE, quando ocorre durante a infância, induz morte neuronal e pode levar a alterações comportamentais e cognitivas na idade adulta. Têm sido descritos na literatura os efeitos benéficos exercidos pelo exercício físico sobre diversos sistemas, incluindo mais recentemente o sistema nervoso central. No presente estudo, investigamos os efeitos de um protocolo de exercício físico de baixa intensidade em esteira sobre as alterações comportamentais e cognitivas em ratos Wistar submetidos ao SE, induzido pela administração de LiCl-pilocarpina, durante períodos iniciais do desenvolvimento. Na primeira parte do estudo, investigamos o perfil de morte neuronal na região CA1 do hipocampo e no córtex perirrinal ao longo de 7 dias após o SE. Nas duas regiões avaliadas, o SE provocou um aumento no número de neurônios em degeneração em todos os tempos avaliados (1, 3 ou 7 dias). A maior morte neuronal ocorreu 1 dia após a convulsão, apresentando uma diminuição na neurodegeneração nos tempos de 3 e 7 dias em ambas estruturas. Outro grupo de animais foi utilizado para avaliar os efeitos do SE sobre parâmetros comportamentais e os efeitos do exercício físico sobre possíveis alterações decorrentes da crise convulsiva. A atividade locomotora na tarefa de campo aberto não foi alterada em nenhum dos quatro grupos estudados (controle, exercício, SE e SE+exercício). No entanto, o grupo SE apresentou um aumento no número de viagens (saídas do *home base*) e uma diminuição no número de paradas por viagem em relação ao grupo exercício, bem como uma diminuição no tamanho das viagens em relação aos grupos exercício e SE+exercício. No teste de reconhecimento de objetos o grupo SE apresentou um déficit significativo na memória de longa duração, sendo que esta alteração foi revertida pelo protocolo de treinamento de baixa intensidade em esteira (grupo SE+exercício). A indução de SE por LiCl-pilocarpina na infância e o treinamento físico de baixa intensidade não alteraram os níveis de ansiedade na tarefa de labirinto em cruz elevado em ratos, na idade adulta. Nossos resultados indicam que a atividade física pode promover uma melhora da função cognitiva em modelos animais, sugerindo uma potencial aplicação dessa intervenção na terapia complementar em pacientes que sofreram SE durante a infância.

ABSTRACT

Status epilepticus (SE) is characterized as a prolonged seizure activity or repeated seizures for a long period (30 min). In immature brains, this kind of seizure is associated with alterations such as neuronal loss and behavioral impairment during adulthood. Several authors have shown that physical exercise improves neurogenesis and can be beneficial to the cognitive function. In this study we evaluated the potential benefits of a low intensity treadmill exercise protocol in order to prevent or modify the long-standing cognitive alterations induced by SE in young Wistar rats. The SE was induced in 16 days old Wistar rats, by the administration of LiCl-pilocarpine. In one subset of animals we evaluated the neuronal loss 1, 3 or 7 days after the SE induction. SE increases the neurodegeneration in the CA1 hippocampal subfield and in the perirhinal cortex in all times tested. The neuronal loss was higher 1 day after lesion, when compared with 3 and 7 days after SE. Another subset of animals was submitted to a low intensity exercise protocol after SE induction, in order to investigate the potential benefits on SE-induced behavioral alterations. In the open field task, we did not find alterations in motor activity among the four groups tested (control, exercised, SE and SE+exercised). SE group presented a high number of trips and a low number of stops per trip when compared with exercised group, as well as a reduction in the trip length when compared with exercised and SE+exercised rats. The second behavioral test performed was the object recognition, where animals from the SE group showed a significantly long-term memory impairment in the adulthood. When SE-induced animals were submitted to the low intensity treadmill exercise protocol, the deficit in the recognition memory was completely reversed. SE-induced during early period of life did not alter any parameter in the plus maze task, indicating no anxiety-like behavior. These data suggest that physical exercise may promote an improvement in cognitive function in seizure-induced rats, suggesting a potential application as complementary therapy in patients that suffered SE during the childhood.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é constituída de cinco partes:

Parte I. Introdução e Objetivos;

Parte II. Os resultados que fazem parte desta Dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, subdividido em: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas;

Parte III. Discussão final;

Parte IV. Perspectivas;

Parte V. Referências bibliográficas referentes à Introdução e Discussão final.

1.EPILEPSIAS

O termo epilepsia engloba um conjunto de distúrbios que acometem o sistema nervoso central (SNC), os quais apresentam em comum crises epiléticas recorrentes, caracterizadas por descargas transitórias, excessivas e hipersincrônicas das células nervosas [1]. A atividade neuronal anormal durante as crises epiléticas ocorre subitamente e pode acometer uma determinada região do SNC ou ocorrer de maneira generalizada, acometendo ambos hemisférios cerebrais [2].

Estima-se que aproximadamente 3% da população mundial é portadora de epilepsia, sendo que cerca de 80% encontram-se em países com baixo índice de desenvolvimento humano [3]. A incidência das epilepsias apresenta-se em uma curva em forma de U, sendo maior durante a infância, diminuindo durante a adolescência e vida adulta [4] e tornando a aumentar após a sexta década de vida [5].

A incidência de epilepsias é maior em crianças do sexo masculino quando comparada com o sexo feminino [4, 6]. Esta diferença sexo-específica varia de acordo com o tipo de distúrbio e com a idade. Durante a infância, aos 5 anos, a incidência é maior em indivíduos do sexo feminino e durante a adolescência tende a ser maior em indivíduos do sexo masculino [6]. A diferença da predominância demonstra diferenças na exposição a fatores de risco, bem como na suscetibilidade sexo-específica [7].

Diferentes fatores podem levar ao desenvolvimento das epilepsias, sendo que 25% a 45% das epilepsias pediátricas estão relacionadas a fatores de risco tais como: infecções do SNC, incidência familiar de epilepsias, traumatismo crânio-encefálico, malformações congênitas, desordens metabólicas,

convulsões neonatais e convulsões febris [7], sendo que o restante possui etiologia desconhecida [8, 9].

A maior parte dos pacientes que apresenta crises epiléticas durante a infância apresenta, na idade adulta, remissão das crises. No entanto, indivíduos jovens portadores de epilepsia, associada a alterações estruturais no SNC, apresentam 60% de chance de desenvolver algum tipo de desordem neurológica ou psiquiátrica durante a idade adulta [10]. Além disso, crises epiléticas ocorridas durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral estão relacionadas a um maior risco de prejuízo intelectual e cognitivo quando comparadas a crises epiléticas ocorridas na adolescência ou na idade adulta.

1.1.Epilepsia do lobo temporal

A epilepsia do lobo temporal (ELT) é a síndrome epilética de maior prevalência na idade adulta [3]. Além disso, cerca de 30% dos pacientes portadores de ELT são refratários ao tratamento farmacológico disponível atualmente, mesmo quando utilizada uma combinação de 2 ou mais anticonvulsivantes. Para os pacientes refratários, a remoção cirúrgica da área epileptogênica (lobotomia) é a única alternativa para remissão e/ou controle das crises, sendo que aproximadamente 80% dos pacientes ficam livres de crises [1].

Cerca de 50% a 70% dos pacientes portadores de epilepsia do lobo temporal apresentam esclerose hipocampal [11]. A esclerose hipocampal induz perda neuronal progressiva e gliose reativa nas regiões CA1 e hilo do hipocampo. No entanto, não alteram a anatomia e morfologia das regiões CA2, giro denteado e subículum [12]. Embora exista uma grande correlação entre epilepsia do lobo temporal e esclerose hipocampal, pouco se sabe sobre como

a esclerose hipocampal influencia na geração de crises convulsivas, sendo que este tema continua gerando grande debate. Meyer et al. [13] observaram que danos ocorridos em fases precoces do desenvolvimento cerebral podem levar a esclerose hipocampal, que por sua vez, pode estar relacionada ao desenvolvimento de epilepsia do lobo temporal. Convulsões febris ou crises epiléticas prolongadas (*status epilepticus* – SE) estão entre as injúrias que quando ocorridas em períodos iniciais do desenvolvimento podem levar a um posterior desenvolvimento de epilepsia do lobo temporal [14]. Estudos retrospectivos em pacientes mostram que aproximadamente 80% dos pacientes com epilepsia do lobo temporal apresentaram, durante os primeiros anos de vida, convulsões febris ou SE [15, 16].

1.2. *Status Epilepticus*

O SE é caracterizado por uma crise epilética prolongada ou crises epiléticas repetidas sem que o indivíduo recupere a consciência entre as crises, sendo uma das emergências médicas mais comuns durante a infância, e que pode ser fatal quando ocorrido precocemente [3]. A maior incidência de crises convulsivas prologadas em períodos iniciais do desenvolvimento está relacionada com um desequilíbrio entre a atividade dos sistemas excitatório e inibitório. Esta maior predisposição do cérebro imaturo ao SE pode estar relacionada à atividade excitatória exercida pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) durante períodos iniciais do desenvolvimento, sendo que na idade adulta esse torna-se o principal neurotransmissor inibitório [17].

O impacto de crises epiléticas prolongadas sob a maturação do SNC não estão totalmente esclarecidas e constituem um importante alvo de investigação [18]. Indivíduos acometidos de SE durante a infância podem

apresentar, na idade adulta, alterações no comportamento emocional, esclerose hipocampal, déficit cognitivo e epilepsia secundária [19].

Inúmeros trabalhos, utilizando tecido cerebral de pacientes com ELT e modelos animais, têm sido realizados no intuito de elucidar as bases fisiológicas e neuroquímicas envolvidas nas alterações cerebrais decorrentes de crises epiléticas de longa duração. Entre os modelos mais bem caracterizados estão o modelo de abrasamento (ou *kindling*) e o modelo da pilocarpina [20]. No modelo de abrasamento são gerados repetidos estímulos elétricos em limiar subconvulsivantes na região límbica (como amígdala, hipocampo, córtex entorrinal), os quais, após alguns dias de estímulos, levam ao desenvolvimento de epilepsia seguida de alterações comportamentais e eletrofisiológicas características [21].

O modelo de SE induzido por pilocarpina é caracterizado pela administração aguda de uma alta dose desse agonista colinérgico. Inicialmente, a atividade epilética se deve a ação estimulatória da pilocarpina sobre o sistema colinérgico, enquanto a manutenção da crise se deve a ativação do sistema glutamatérgico [22]. Clifford et al. [23] demonstraram que um pré-tratamento com cloreto de lítio potencializa a ação epileptogênica da pilocarpina, possibilitando uma redução na dose administrada, o que diminui consideravelmente os efeitos colinérgicos periféricos e conseqüentemente a mortalidade, sem alterar, no entanto, o padrão convulsivo. O padrão da crise convulsiva durante o SE induzido pela combinação de LiCl-pilocarpina segue a seguinte ordem: nos primeiros 5 min os animais apresentam hiperatividade, tremores e clonismos de patas. Após este período os animais apresentam um aumento da atividade motora, que acarreta SE entre 30 e 40 min após a administração da pilocarpina. Durante o SE os animais apresentam

automatismos orofaciais, salivação, clonismos de patas e perda de equilíbrio. O SE induzido por LiCl-pilocarpina apresenta uma intensa atividade elétrica tanto a nível cortical quanto hipocampal [24]. Wang et al. [25], utilizando o modelo de pilocarpina, demonstraram que uma convulsão de longa duração em ratos adultos induz massiva neurodegeneração em diversas áreas cerebrais até 14 dias após o insulto. No mesmo trabalho foi provado que a grande maioria dos neurônios em degeneração estavam sofrendo processo apoptótico (96%) e que na sua grande maioria (88%) eram neurônios GABAérgicos. Após o SE, os animais iniciam um período onde há a ausência de alterações eletroencefalográficas bem como de crises recorrentes, denominado fase latente. Após a fase latente, aproximadamente 80% dos animais passam a apresentar crises espontâneas de origem límbica acompanhadas de alterações comportamentais [26, 27].

2.ATIVIDADE FÍSICA

Diversos benefícios relacionados ao exercício físico vêm sendo elucidados nas últimas décadas. Está bem estabelecido que o exercício físico melhora o sistema cardiovascular, reduzindo os riscos de hipertensão e parada cardíaca [28, 29] reduz o risco de AVC [30], auxilia no controle glicêmico de pacientes diabéticos [31, 32], além de promover a melhora da saúde mental [28].

2.1.Exercício e cognição

Sibley and Etnier [33], através de uma meta-análise, encontraram uma correlação positiva entre a prática de exercícios físicos e uma melhora cognitiva em crianças em idade escolar. Além disto, foi demonstrado que logo

após a prática de exercício aeróbico, crianças apresentam uma melhora na velocidade de reação [34] e, após corrida de alta intensidade, foi observada uma melhora no aprendizado, que está relacionada com um aumento dos níveis de BDNF e dopamina [35]. Em adultos jovens (média de 33 anos), o treinamento aeróbico por três meses gerou uma melhora na cognição logo após o exercício, além de induzir neurogênese [36].

O processo de envelhecimento está relacionado com a alteração de diferentes fatores, como, atrofia do córtex e do hipocampo, diminuição da capacidade cardiorrespiratória, além de uma diminuição dos processos de memória. O exercício físico tem se mostrado um fator determinante na melhora e manutenção da capacidade física e mental ao longo da vida [37, 38]. O treinamento físico aumenta a cognição e desacelera a diminuição da memória relacionada com a idade [39]. A prática de atividade física entre 15 e 25 anos apresenta uma correlação positiva com a velocidade de processamento de informações quando testadas na idade de 62 a 85 anos [40]. O treinamento de força diminui a perda de massa muscular gerada pelo envelhecimento, sendo que aliado a uma alimentação correta, a massa muscular pode inclusive aumentar em indivíduos idosos [41].

O exercício é utilizado como intervenção em diferentes doenças, no intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Schwartz [42] provou que, para indivíduos com câncer, um treinamento de corrida com intensidade leve a moderada é eficaz no controle do peso, na redução da fadiga induzida pelo tratamento e levou a uma melhora na qualidade de vida dos pacientes. Indivíduos idosos (<75 anos) com insuficiência cardíaca apresentaram uma melhora na capacidade de se exercitar e na qualidade de vida após quatro meses de treinamento em bicicleta [43]. Efeito semelhante foi observado em

crianças com asma, com uma melhora na qualidade de vida e na capacidade pulmonar após dois meses de treinamento moderado de basquete [44]. Exercícios na água por 10 ou 20 semanas apresentaram um efeito positivo na percepção da qualidade de vida em indivíduos obesos com osteoartrite [45].

Estudos envolvendo exercício físico e doenças degenerativas demonstram uma melhora no quadro da doença. Pacientes com Alzheimer submetidos a um programa de treinamento de 12 semanas apresentaram importantes melhoras no desempenho das atividades diárias [46]. Além disto, o exercício físico apresenta um caráter preventivo no desenvolvimento da doença de Alzheimer [47]. Pacientes com Parkinson e que participam de aulas de tango apresentam uma melhora na mobilidade, na qualidade de vida e no convívio social [48]. Um treinamento aeróbico por um período de seis meses se mostrou eficaz na melhora das capacidades de abstração, flexibilidade mental e atenção em pacientes com Parkinson quando comparados com pacientes não treinados [49].

2.2.Exercício voluntário e exercício forçado

Diferentes protocolos de exercício físico têm sido utilizados em modelos animais. Os protocolos de atividade física utilizados podem ser classificados como exercício voluntário e exercício forçado, sendo que no exercício voluntário de corrida é utilizada a roda de exercício e a corrida forçada é realizada em esteira ergométrica. Variações nos protocolos de exercício e na duração do treinamento podem levar a diferentes resultados experimentais. Leasure e Jones [50] demonstraram que a realização de exercício forçado por oito meses promove uma maior neurogênese em relação ao exercício voluntário. O exercício em esteira, mas não o exercício voluntário, por três

semanas, induz neuroproteção em ratos submetidos ao modelo de acidente vascular cerebral [31]. Em um trabalho investigando a influência do exercício voluntário ou forçado em camundongos submetidos ao modelo de Alzheimer, Yuede et al. [51] demonstraram que o exercício voluntário produz melhores resultados quando comparado com o exercício forçado.

Animais submetidos a protocolos de exercício voluntário ou forçado apresentam melhoras em diferentes tarefas comportamentais como o labirinto aquático de Morris, o labirinto em Y elevado, o labirinto em T elevado e o labirinto radial [52]. Em outras tarefas dependentes do hipocampo como medo condicionado, esquiva passiva e reconhecimento de objetos ambos protocolos mostraram-se eficientes [53, 54].

Kim et al. [55] demonstraram que o exercício em esteira induz neurogênese e que esta alteração é influenciada pela intensidade do exercício e pela duração do treinamento. Um protocolo de exercício de baixa intensidade se mostrou mais eficaz na indução de neurogênese quando comparado com exercício de média ou alta intensidade.

2.3.Exercício e epilepsia

Muitos indivíduos epiléticos são desencorajados a participar da prática de exercícios físicos, independente da modalidade e intensidade do exercício, bem como da frequência e do tipo de crises apresentada pelo paciente. O desencorajamento recai principalmente no receio por parte do corpo médico de que ocorra um aumento da frequência das crises devido à atividade física. Embora essas recomendações médicas tenham sido revistas após pesquisas mais aprofundadas envolvendo o tema, o estigma permanece e indivíduos epiléticos continuam sendo menos ativos do que a população em geral [56].

Desta forma, pacientes epiléticos podem apresentar aumento de peso, diminuição da capacidade aeróbica, diminuição da autoestima, e aumentar os níveis de ansiedade e depressão [57].

Segundo Nakken [58], indivíduos epiléticos podem participar de atividades físicas que apresentem baixo risco quando acompanhados por um profissional. A redução de riscos para pacientes epiléticos depende dos seguintes cuidados: monitoramento adequado da medicação, realização da atividade sob acompanhamento de profissionais e familiares treinados e a não realização de exercícios de longa duração que possam levar a hipoglicemia e desidratação [56, 59]. Em pacientes epiléticos, o exercício físico pode ser utilizado tanto como coadjuvante no tratamento quanto como forma de melhoria da saúde em geral e da qualidade de vida [60].

Embora a literatura envolvendo epilepsia e exercício físico em modelos animais seja bastante restrita, foram demonstrados importantes benefícios decorrentes do treinamento. Em um trabalho utilizando o modelo de abrasamento, Arida et al. [61] demonstraram que um treinamento prévio em esteiras por 45 dias é capaz de aumentar a resistência aos estímulos elétricos, aumentando o número de estímulos necessários para os animais apresentarem SE. Induzindo epilepsia com a administração de pilocarpina, Arida et al. [62] investigaram o efeito de um programa de treinamento de baixa intensidade em esteira com frequência de 7 dias por semana durante 45 dias. Os animais foram monitorados por 45 dias após o surgimento das crises, 45 dias em que foram submetidos à atividade física e 45 dias após o treinamento, sendo que os animais treinados apresentaram uma diminuição da frequência das crises durante o período de treinamento e também nos 45 dias após o término do treinamento.

O treinamento físico se mostrou capaz de reduzir a frequência de disparos de neurônios hipocâmpais em fatias cerebrais de ratos epiléticos na presença de altas concentrações de potássio ou na presença do inibidor gabaérgico bicuculina [63]. Van Praag et al. [64] demonstraram que o treinamento físico em camundongos epiléticos é capaz de reverter a diminuição do potencial de longa duração (LTP - long-term potentiation) apresentado por animais epiléticos. Rambo et al. [65] demonstraram que um treinamento de nado forçado ou suplementação com creatina atenuam a crise convulsiva induzida por pentilenotetrazol (PTZ) e que a combinação dos dois tratamentos apresenta um aumento no controle da convulsão.

3.OBJETIVOS

3.1.Objetivo geral

Investigar os efeitos do exercício físico de baixa intensidade sobre as alterações comportamentais induzidas pelo *status epilepticus* em animais jovens.

3.2.Objetivos específicos

Avaliar o perfil de neurodegeneração em ratos jovens submetidos a crises convulsivas de longa duração induzidas por LiCl-pilocarpina.

Avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico de baixa intensidade nas tarefas de campo aberto, labirinto em cruz elevado e reconhecimento de objetos em ratos submetidos ao modelo de SE induzido em períodos iniciais do desenvolvimento.

Parte II. RESULTADOS

CAPÍTULO I

LOW INTENSITY PHYSICAL TRAINING RECOVERS MEMORY IN RATS AFTER *STATUS EPILEPTICUS*-INDUCTION IN EARLY LIFE

Sandro Daniel Córdova*, Cássio Moraes Loss, Diogo Losch de Oliveira

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO *EPILEPSY RESEARCH*

**LOW INTENSITY PHYSICAL TRAINING RECOVERS MEMORY IN RATS
AFTER STATUS EPILEPTICUS-INDUCTION IN EARLY LIFE**

Sandro Daniel Córdova*, Cássio Moraes Loss, Diogo Losch de Oliveira

*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.*

*Address for correspondence:

Sandro Daniel Córdova

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS.

Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo.

CEP: 90035-003

Porto alegre, RS, BRAZIL

Tel: +55 51 33085555

Fax: +55 51 33085540

E-mail: sandrocordova@gmail.com

Running title

Behavioral effect of physical training and *status epilepticus* in rats.

Key Words

Status epilepticus; physical training; pilocarpine; hippocampus; perirhinal cortex; neurodegeneration.

SUMMARY

Status epilepticus (SE) in immature brains is associated with neuronal loss and behavioral impairment at adulthood. Here, we evaluated the time-course of neuronal loss, as well the potential benefits of a low intensity treadmill training on long-standing cognitive impairment in SE-rats. SE induced neuronal loss in the CA1 hippocampal subfield and in the perirhinal cortex until 7 days after SE onset. At adulthood, SE group presented a high number of trips and a low number of stops per trip, as well as a reduction in the trip length in the open field when compared with exercised and SE+exercised groups. Moreover, a long-term memory impairment was displayed by SE group in the object recognition and the training protocol completely reversed this alteration. These data suggest that physical exercise may promote an improvement in cognitive function in SE-induced rats, suggesting it as a potential application for patients that suffered SE during the childhood.

Key Words

Status epilepticus; pilocarpine; neuronal death; physical training; learning and memory.

1. Introduction

Epilepsy is one of the most frequent neurological disturbs around the world [1] and is more frequently in children than in adults [2]. The effects of epileptic activity on developing brain are not completely understood and still under investigation [3, 4]. *Status epilepticus* (SE) is a common childhood neurological emergency defined as a seizure with at least 30 min of duration or recurrent convulsions occurring over a 30-min period without recovery of consciousness [5]. SE has been frequently associated with morbidity and mortality and in some cases can cause neurological dysfunction, such as mental retardation or paresis, school or learning problems, and memory or linguistic skills [6].

Several animal models have been shown that SE induces neuronal damage when occurring during early periods of life. Sankar et al. [7] found an elevation in the serum levels of neuron specific enolase one day after SE induction. Moreover, SE-submitted rats presented DNA fragmentation and apoptotic bodies in the hippocampus indicating that neuronal death may occurs by apoptosis [8]. Wang et al. [9] using the pilocarpine model demonstrate that neuronal degeneration in adult rats occurs in several brain regions at last 14 days after the insult. Administration of LiCl-pilocarpine in P16 or P20 causes degenerative process in the brain and induces mossy fiber sprouting as well as cognitive impairments in the adulthood [10]. Kubová et al. [11] showed that LiCl-pilocarpine-induced SE on P12 or P25 causes memory impairments 3 months after the insult. These cognitive impairments found in animals models of SE are similar to those presented by human patients. Jambaqué et al. [12] found that

child who suffered a SE at age 5 presented cognitive impairment (IQ of 62) with 7 years old.

Physical training has been used as a therapeutic intervention which produces benefits to cognitive functions after brain damage. Exercise has shown a beneficial effect on cognitions in Parkinson's and Alzheimer's diseases [13-15]. Chae et al. [16] demonstrated that a 6 weeks training protocol in treadmill improves cognitive function, increases nerve growth factor (NGF) levels and BrdU-labeled cells in the dentate gyrus of hippocampus in diabetic rats. Voluntary physical activity improves the spatial memory and increases the hippocampal content of BDNF in mice subjected to pilocarpine-induced SE [17]. Moreover, Arida et al. [18], using a kindling model of SE, have demonstrated that physical training increases the resistance to seizure development in rats. Voluntary running increases learning and memory in mice who have been submitted to pilocarpine-induced SE [17].

Therefore, the aim of this study was to investigate the potential benefits of a low intensity treadmill exercise protocol on behavioral tasks applied on adult rats subjected to a LiCl-pilocarpine-induced SE model during early period of life. We also evaluated the time-course of neuronal loss in SE-induced young rats.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURE

2.1. Materials

Pilocarpine hydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich (USA), and Fluoro-Jade B was purchased from Chemicon, Inc. (USA). Others chemicals were purchased from Nuclear (Brazil).

2.2. Subjects

Male young Wistar rats (15 days post natal) were obtained from local breeding. The litters were culled to 8 pups. The day of birth was defined as day 0 and the animals were weaned on postnatal day 21. After weaning, animals were housed in standard polypropylene cages in groups of 4-5 animals with food and water *ad libitum* (21 ± 1 °C room temperature) under a 12h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The handling and care of the animals were conducted according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals from National Institutes of Health (NIH Publications No. 80-23, revised 1996). *All procedures in the present study were approved by the Committee of Ethics from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol number #2008058).*

2.3. Induction of status epilepticus

Rat pups 15 days old were injected with a solution of LiCl (3 mEq/kg, i.p.) 12-18h prior to pilocarpine hydrochloride administration (60 mg/kg, i.p.) [8, 19]. Control animals were handled and housed in the same manner and received an equal volume of saline solution (0.9% NaCl). Rats were put in individual plastic cages at 34°C (nest temperature) for seizure observation. The duration of SE was evaluated only by behavioral measures. The rats were allowed to spontaneously recover from SE. Each experimental group contained pups from

several litters. After SE induction, animals were divided in two main subsets. The first subset was used to determine the time-course of SE-induced neuronal loss and the second subset was submitted to the exercise protocol.

2.4. Fluoro-Jade B staining

Animals from first subset were divided in two groups: control and SE. The Fluoro-Jade B staining was performed as described by Schmued et al. [20]. Briefly, 1, 3 and 7 days after SE induction rats were deeply anesthetized by i.p. injection of ketamine (90mg/kg) and xylazine (12 mg/kg) and sequentially perfused through the heart with 200 mL of ice-cold 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) followed by 100 mL of ice-cold fixative solution 4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). The brains were removed and immersed in fixative solution plus 30% sucrose until the brains sank to the bottom of the chamber. Frozen 30- μ m coronal sections were mounted onto gelatin-coated slides and dried at 37° C overnight. Then, they were immersed in absolute alcohol for 3 min, followed by 70% ethanol for 2 min, and distilled water for 2 min. The slides were transferred to 0.06% potassium permanganate for 15 min. After rinsing with distilled water for 2 min, the slides were incubated for 30 min in 0.001% Fluoro-Jade B solution made in 0.1% acetic acid, rinsed in water, dried at 37° C, dehydrated in xylene, and cover slipped. Sections were examined using a Nikon Eclipse E600 epi-fluorescence microscope.

2.5. Exercise protocol

Animals from the second subset were divided in 4 groups: control (C – n=10), exercised (E – n=10), *status epilepticus* (SE – n=11) and *status*

epilepticus+exercised (SE+E – n=11). Seven days after SE induction, animals from E and SE+E groups were submitted to a low intensity exercise protocol during 4 weeks. Rats run 30-min a day in one four-line treadmill, 5 days a week. The warm-up consisted of 2m/min into the first 5-min, followed by 5m/min to the next 5 min, and 8m/min in the last 20 min [21]. Control and SE animals were left in the treadmill for 30 min a day without running.

2.6. Behavioral tasks

After the end of exercise protocol, animals were submitted to behavioral tasks. Open-field, object recognition and elevated plus maze task were carried out on P56, P57-58 and P60, respectively. For all behavioral procedures, animals were put on the testing room (temperature $21 \pm 2^\circ$ C) 1h before the beginning of the task in order to habituate. Since the rodents are nocturnal, all tasks were performed between 6:00 and 10:00 p.m. The behavior was recorded and analyzed using the ANY-Maze® video-tracking system (Stoelting, CO). Between every trial, apparatuses were cleaned with ethanol 50%.

2.6.1. Open Field

The test consisted of a circular wooden black arena with 60x50 cm (diameter x height). The floor was virtually divided into 28 squares (12 central and 16 peripheral). The testing room was illuminated by two lamps directed to the ceiling. The light intensity was 15 Lux in the center of arena. Each animal was individually placed in the periphery of the arena and was left free to explore it for 15 minutes. Based on study by Eilam (2003), the following behavioral parameters were quantified.

2.6.1.1 Level of activity:

Number of rearing and grooming.

Distance traveled: Overall distance that a vole traveled during the 15-min observation.

Locomoting time: Overall duration of locomoting periods, during which voles accumulated the traveled distance.

Number of stops: The incidence of “non-locomoting” intervals that were bounded by “locomoting” intervals.

Inter-stops distance: The metric distance traveled between two consecutive stops (total distance divided by the total number of stops).

2.6.1.2 Temporal organization of locomotion

Number of trips: By ranking squares (places) according to the accumulated “non-locomoting” intervals, the place with the highest rank was termed “home-base”. Intervals between consecutive stops at the home-base were scored as “trips” to the arena.

Trip length: Metric distance traveled in a round-trip (= total distance divided by the total number of trips).

Stops/trip: Number of stops taken between two successive stops at the home-base (= total number of stops divided by the total number of trips).

2.6.1.3 Spatial distribution

Distance traveled along the perimeter: traveled distance along the vicinity of the walls of the arena.

Locomoting time spent along the perimeter: traveling time along the vicinity of the walls of the arena.

2.6.2. Object recognition

The arena used to object recognition was the same used to open field task. Two glass made objects with comparable size (10 cm high) were fixed to the apparatus 10 cm away the wall and 15 cm from each other. In the training session, animals were allowed to explore two identical objects (object A) for 5 minutes. To evaluate the short-term memory (STM), animals were allowed to explore for 5 min one familiar object and a new one (object B) 3 hours after the training session. Twenty four hours after the training session, long-term memory (LTM) was assessed by changing object B for a new form (object C) and animals were allowed to explore for 5 min [22].

2.6.3. Elevated plus-maze

The maze consisted of two open arms (50×10 cm) and two closed arms (50×10×40 cm) with the arms of each type opposite to each other [23]. The maze was elevated to a height of 50 cm of floor. The experiment was leading in a room illuminated by red light. The light intensity in the center of apparatus was 5 Lux. Rats were placed into the center of the maze facing a closed arm and was left free to explore it for 5 minutes. Number of entries, time spent into the arms, number of risk assessment behaviors and total distance travelled were registered.

2.7. Data analysis

Fluoro-Jade B-positive cell data were shown as mean±S.E.M. Quantification of Fluoro-Jade B-positive neuronal cells was performed in coronal brain sections on representative microscopic fields corresponding to plate 30-32 of The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates from Paxinos and Watson [24]. Cells exhibiting bright green fluorescence and profiles of neuronal

somas were counted in the Image-J software while Fluoro-Jade B-positive fragments were not counted.

All behavioral data were expressed as mean \pm S.E.M. For open-field and elevated plus maze tasks, one-way ANOVA followed by the Tukey's *post hoc* test for unequal samples were used. Data from object recognition were analyzed by two-way ANOVA followed by the Tukey's *post hoc* test for unequal samples.

3. RESULTS

3.1. Characterization of status epilepticus

The behavioral pattern of SE-induced rats was observed at last 3 hours and was well correlated with the description of Hirsch et al [19]. Systemic administration of LiCl-pilocarpine produced defecation, salivation, body tremor, and scratching within 2 to 5 min. This behavioral pattern progressed within 8 to 12 min to increased levels of motor activity and culminated in SE in all animals. SE was characterized by sustained orofacial automatisms, salivation, chewing, forelimb clonus, loss of the righting reflex and falling.

3.2. Status epilepticus-induced neuronal degeneration in hippocampus and cortex of young rats

LiCl-pilocarpine administration increased the number of Fluoro-Jade B-labeled neurons in CA1 hippocampal subfield and perihinal cortex in all times evaluated (Fig. 1). The number of Fluoro-Jade-B positive neurons decreased 3 and 7 days after SE-induction when compared with 1 day after the SE (Table 1). Control animals did not display Fluoro-Jade B-positive neurons in the brain regions.

3.3. Effects of status epilepticus and treadmill exercise on open field task

There was no difference between every groups regarding the total distance traveled ($F= 0.2711$; $p>0.05$), the whole-body grooming ($F= 0.8514$; $p>0.05$) and the total number of rearing ($F= 0.4300$; $p>0.05$). We did not find any difference in the distance along the time between groups neither in the mobile time ($F_{\text{interaction}}= 0.5755$; $p>0.05$). The apparatus was divided into 28 squares to identify where the animal spend more time and this square was

defined as the home base. The total time immobile in the home base was similar between groups ($F= 2.670$; $p>0.05$) (Fig. 2A).

We also evaluated how many times animal leaves and come back to the home base (number of trips), the number of stops per trip and how long were every trip (distance/trip). SE-rats performed more trips during the test when compared with the exercised group ($F= 4.464$; $p<0.05$), although animals in the groups exercised and SE+exercised travelled a highest distance per trip when compared with the SE group ($F= 4.931$; $p<0.05$). The time spent in the center of the arena was the same for all groups.

We did not find any difference on percentages of time and distance, as well as the number of stops along the vicinity of the apparatus wall (Table 2).

3.4. Effects of status epilepticus and treadmill exercise on object recognition

During the training session, animals explored equally the two stimuli objects (Fig. 3). For the STM test session, all groups spent more than 65% of their object interaction time with the novel object ($F_{interaction}= 1.109$; $p<0.05$). However, for the LTM test session animals from SE group presented a decreased exploration time for the novel object (57.72%) when compared with animals from control (66.65%; $p<0.05$), exercised (66.70%; $p<0.05$) and SE+exercised (71.06%; $p<0.01$) groups (Fig. 3). There was no difference in the mean of absolute object interaction time in all groups (data not shown).

3.5. Effects of status epilepticus and treadmill exercise on elevated plus maze

There was no difference among experimental groups in the time spent ($F= 1.649$; $p>0.05$) and in the number of entries in the open arms ($F= 0.6120$;

$p > 0.05$), as well as in the number of risk assessment behaviors ($F = 0.7024$; $p > 0.05$) (Fig. 4).

4. DISCUSSION

Several studies have frequently described cognitive and behavioral abnormalities in adult rats with a history of SE during critical periods of brain development [25]. The latent period after the brain insult may offer a window of opportunity in which an appropriate prophylactic treatment may stop or modify these alterations. However, administration of conventional “antiepileptic drugs” (AEDs), such as phenytoin and carbamazepine, has failed to prevent or modify the SE-induced cognitive and behavioral abnormalities [26, 27].

It is known that physical exercise can modify brain physiology and cognitive function both in humans and laboratory animals. Moreover, it has been used in the prevention or treatment of a variety memory impairments, like those caused by natural aging [28, 29], morphine administration [30] and prenatal ethanol exposure [31]. On the basis of this concept, in this study we evaluated the potential benefits of a low intensity treadmill exercise protocol in to recover the long-standing cognitive alterations induced by SE in young rats. To date, this is the first report about the effect of physical exercise on cognitive deficits induced by SE in young rats.

The induction of SE in early period of brain development induced expressive neuronal loss in CA1 hippocampal subfield and perihinal cortex up to 7 days after the insult (Fig. 1). Although previous studies have demonstrated that the developing brain may be relatively resistant to seizure-induced morphological alterations [32], it has been showed that SE may cause massive neuronal loss in hippocampus and thalamus in young rats [8, 33]. Moreover, Wang et al. [9] showed that pilocarpine administration in adult rats caused massive neuronal loss in several brain areas until 14 days after the insult, with dense distribution in the cerebral cortex and in hippocampus.

In addition to neuronal damage, animals submitted to SE early in life showed a significant impairment in long-term memory 42 days after LiCl-pilocarpine administration (Fig. 3), indicating that early-life prolonged seizures can cause long-standing cognitive impairment. Similar results were achieved in other memory tasks, such as Morris water maze and inhibitory avoidance task [33, 34]. However the cellular and physiologic mechanisms involved in SE-induced neurodegeneration are still under investigation. Neuronal damage observed in the SE group (Fig. 1) may be related to this cognitive deficit, whereas several works have demonstrated that the integrity of perirhinal cortex is critically to the recognition learning in rats [35]. Animals with selective lesions on perirhinal cortex demonstrated a significantly object recognition impairment 24h after training session when compared to the control unlesioned animals [35]. Nevertheless, hippocampal role on recognition memory formation could not be excluded, since these structures interact anatomical and functionally via the entorhinal cortex [36-38] as well as directly [39, 40].

When SE-induced animals were submitted to a low intensity forced treadmill exercise protocol, the recognition memory impairment was completely reversed when compared to the untrained SE group (Fig. 3). Several works have shown the beneficial effects of physical exercise on the brain functions, which include neurogenesis [41-44], cognitive improvement [16, 45-47] and brain function recovery after different insults [48, 49]. The neurochemical and physiological mechanisms involved in beneficial effects of exercise on the brain area still under investigation, however studies have demonstrated that physical training increases the long-term potentiation [50] as well raises the BDNF levels in mouse hippocampi [51]. Moreover, the exercise protocol did not alter any cognitive parameters *per se*, which is in agreement with others works that

demonstrated that acute and chronic physical exercise in a treadmill had no effect *per se* on spatial and recognition learning [52, 53].

In order to investigate the effects of SE on locomotor and exploratory activities as well as to eliminate the possibility of an impaired locomotion on object recognition task performance, animals were also tested in the open field task. Both SE and treadmill training did not induce any alterations in gross exploratory activity, such as total distance traveled and number of rearings and groomings (Fig. 2A). Nevertheless, the spatio-temporal organization of locomotor and exploratory activity was altered in the SE group when compared with the exercised and SE+exercised groups. These data suggest that low intensity exercise recover spatial organization memory altered by LiCl-pilocarpine administration.

SE- and training-induced behavioral alterations in object recognition and open field tasks did not appear to be related with increased anxiety levels, since there was no difference among groups in the elevated plus maze (Fig. 4). This data is in agreement to work performed by Salim et al. [54], which showed that rats subjected to a moderate intensity treadmill exercise protocol during 4 weeks (30-60 min/day) did not present anxiety-like behaviors in the light-dark test. However, the effect of exercise on anxiety-like behaviors is not a consensus in the literature, whereas Fulk et al. [55] showed a reduction of anxiety levels in rats submitted to a moderated intensity treadmill for 45 min/day, five days a week, for ten weeks.

In conclusion, the present study showed that SE during early periods of life (P16) promotes long-last neuronal degeneration, observed until 7 days after SE induction. Moreover, LiCl-pilocarpine-treated rats showed a significant impairment in the recognition memory at adulthood, which was reversed by a

low intensity forced treadmill protocol. These observations suggest that exercise may be considered as potential alternative and complementary non-pharmacological therapy for patients that suffer SE during childhood.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian funding agencies, CNPq, FAPERGS, and CAPES and by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” # 01.06.0842-00.

5. REFERENCES

- [1] Elger C, Schmidt D. Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy Behav* 2008;12: 501-39.
- [2] Cowan LD. The epidemiology of the epilepsies in children. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8: 171-81.
- [3] Wasterlain CG. Recurrent seizures in the developing brain are harmful. *Epilepsia* 1997;38: 728-34.
- [4] Raspall-Chaure M, Chin RF, Neville BG, Scott RC. Outcome of paediatric convulsive status epilepticus: a systematic review. *Lancet Neurol* 2006;5: 769-79.
- [5] Novorol CL, Chin RF, Scott RC. Outcome of convulsive status epilepticus: a review. *Arch Dis Child* 2007;92: 948-51.
- [6] Kwong KL, Chang K, Lam SY. Features predicting adverse outcomes of status epilepticus in childhood. *Hong Kong Med J* 2004;10: 156-9.
- [7] Sankar R, Shin DH, Wasterlain CG. Serum neuron-specific enolase is a marker for neuronal damage following status epilepticus in the rat. *Epilepsy Res* 1997;28: 129-36.
- [8] Sankar R, Shin DH, Liu H, Mazarati A, Pereira de Vasconcelos A, Wasterlain CG. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci* 1998;18: 8382-93.
- [9] Wang L, Liu YH, Huang YG, Chen LW. Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. *Brain Res* 2008;1241: 157-67.
- [10] Cilio MR, Sogawa Y, Cha BH, Liu X, Huang LT, Holmes GL. Long-term effects of status epilepticus in the immature brain are specific for age and model. *Epilepsia* 2003;44: 518-28.
- [11] Kubová H, Mares P, Suchomelová L, Brozek G, Druga R, Pitkänen A. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur J Neurosci* 2004;19: 3255-65.
- [12] Jambaqué I, Hertz-Pannier L, Mikaeloff Y, Martins S, Peudenier S, Dulac O, Chiron C. Severe memory impairment in a child with bihippocampal injury after status epilepticus. *Dev Med Child Neurol* 2006;48: 223-6.
- [13] Liu HL, Zhao G, Cai K, Zhao HH, Shi LD. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. *Behav Brain Res* 2011;218: 308-14.
- [14] Santana-Sosa E, Barriopedro MI, López-Mojares LM, Pérez M, Lucia A. Exercise training is beneficial for Alzheimer's patients. *Int J Sports Med* 2008;29: 845-50.
- [15] Smith AD, Zigmond MJ. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. *Exp Neurol* 2003;184: 31-9.
- [16] Chae CH, Jung SL, An SH, Park BY, Wang SW, Cho IH, Cho JY, Kim HT. Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. *Neuroscience* 2009;164: 1665-73.
- [17] Sartori CR, Pelágio FC, Teixeira SA, Valentinuzzi VS, Nascimento AL, Rogério F, Muscará MN, Ferrari EA, Langone F. Effects of voluntary running on spatial memory and mature brain-derived neurotrophic factor expression in mice hippocampus after status epilepticus. *Behav Brain Res* 2009;203: 165-72.
- [18] Arida R, de Jesus Vieira A, Cavalheiro E. Effect of physical exercise on kindling development. *Epilepsy Res* 1998;30: 127-32.
- [19] Hirsch E, Baram T, Snead Or. Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res* 1992;583: 120-6.

- [20] Schmued L, Albertson C, Slikker WJ. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 1997;751: 37-46.
- [21] Kim YP, Kim HB, Jang MH, Lim BV, Kim YJ, Kim H, Kim SS, Kim EH, Kim CJ. Magnitude- and time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Int J Sports Med* 2003;24: 114-7.
- [22] Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 2006;1: 1306-11.
- [23] Pellow S, Chopin P, File S, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14: 149-67.
- [24] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press; 1998.
- [25] Kaindl AM, Ikonomidou C. Glutamate antagonists are neurotoxins for the developing brain. *Neurotox Res* 2007;11: 203-18.
- [26] Temkin NR, Jarell AD, Anderson GD. Antiepileptogenic agents: how close are we? *Drugs* 2001;61: 1045-55.
- [27] Temkin NR. Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. *Epilepsia* 2009;50 Suppl 2: 10-3.
- [28] Garza AA, Ha TG, Garcia C, Chen MJ, Russo-Neustadt AA. Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;77: 209-20.
- [29] van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 2005;25: 8680-5.
- [30] Alaei H, Borjeian L, Azizi M, Orian S, Pourshanazari A, Hanninen O. Treadmill running reverses retention deficit induced by morphine. *Eur J Pharmacol* 2006;536: 138-41.
- [31] Christie BR, Swann SE, Fox CJ, Froc D, Lieblich SE, Redila V, Webber A. Voluntary exercise rescues deficits in spatial memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. *Eur J Neurosci* 2005;21: 1719-26.
- [32] Haas KZ, Sperber EF, Opanashuk LA, Stanton PK, Moshé SL. Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. *Hippocampus* 2001;11: 615-25.
- [33] de Oliveira DL, Fischer A, Jorge RS, da Silva MC, Leite M, Gonçalves CA, Quillfeldt JA, Souza DO, e Souza TM, Wofchuk S. Effects of early-life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein. *Epilepsia* 2008;49: 842-52.
- [34] Liu ZW, Zhang T, Yang Z. Involvement of nitric oxide in spatial memory deficits in status epilepticus rats. *Neurochem Res* 2007;32: 1875-83.
- [35] Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 2004;24: 5901-8.
- [36] Burwell RD, Amaral DG. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 1998;398: 179-205.
- [37] Burwell RD, Amaral DG. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 1998;391: 293-321.
- [38] Deacon TW, Eichenbaum H, Rosenberg P, Eckmann KW. Afferent connections of the perirhinal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 1983;220: 168-90.
- [39] Yukie M. Connections between the medial temporal cortex and the CA1 subfield of the hippocampal formation in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *J Comp Neurol* 2000;423: 282-98.
- [40] Liu P, Bilkey DK. Direct connection between perirhinal cortex and hippocampus is a major constituent of the lateral perforant path. *Hippocampus* 1996;6: 125-35.

- [41] Creer DJ, Romberg C, Saksida LM, van Praag H, Bussey TJ. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107: 2367-72.
- [42] Arida R, Cavalheiro E, de Albuquerque M, da Silva A, Scorza F. Physical exercise in epilepsy: the case in favor. *Epilepsy Behav* 2007;11: 478-9.
- [43] Bjørnebekk A, Mathé AA, Brené S. The antidepressant effect of running is associated with increased hippocampal cell proliferation. *Int J Neuropsychopharmacol* 2005;8: 357-68.
- [44] Ang ET, Wong PT, Moochhala S, Ng YK. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience* 2003;118: 335-45.
- [45] Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience* 2010;167: 588-97.
- [46] Griffin EW, Bechara RG, Birch AM, Kelly AM. Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism. *Hippocampus* 2009;19: 973-80.
- [47] Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 2002;25: 295-301.
- [48] Ferrer-Alcon M, Winkler-Hirt C, Madani R, Perrin FE, Kato AC. Low intensity exercise attenuates disease progression and stimulates cell proliferation in the spinal cord of a mouse model with progressive motor neuronopathy. *Neuroscience* 2008;152: 291-5.
- [49] Gobbo OL, O'Mara SM. Exercise, but not environmental enrichment, improves learning after kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in association with an increase in brain-derived neurotrophic factor. *Behav Brain Res* 2005;159: 21-6.
- [50] O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res* 2007;176: 362-6.
- [51] Lafenêtre P, Leske O, Ma-Högemeie Z, Haghikia A, Bichler Z, Wahle P, Heumann R. Exercise can rescue recognition memory impairment in a model with reduced adult hippocampal neurogenesis. *Front Behav Neurosci* 2010;3: 34.
- [52] Barnes CA, Forster MJ, Fleshner M, Ahanotu EN, Laudenslager ML, Mazzeo RS, Maier SF, Lal H. Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody response in aged F-344 rats. *Neurobiol Aging* 1991;12: 47-53.
- [53] Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cienc* 2008;80: 301-9.
- [54] Salim S, Sarraj N, Taneja M, Saha K, Tejada-Simon MV, Chugh G. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav Brain Res* 2010;208: 545-52.
- [55] Fulk LJ, Stock HS, Lynn A, Marshall J, Wilson MA, Hand GA. Chronic physical exercise reduces anxiety-like behavior in rats. *Int J Sports Med* 2004;25: 78-82.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. *Status epilepticus* induces neuronal degeneration in hippocampus and cortex of young rats. Brain coronal sections showing the distribution of Fluoro-Jade B-labeled degenerating neurons in CA1 hippocampal subfield (D-F) and perirhinal cortex (J-L) 1 day, 3 days and 7 days after LiCl-pilocarpine-induced SE. There was found a markedly increased number of Fluoro-Jade B-labeled neurons in brain sections of SE-induced animals when compared with their controls (A-C; G-I). Scale bars: 100 μ m.

Fig. 2. Effects of *status epilepticus* and treadmill exercise in open field task. The task was performed on P56. Data show end points (A) and spatio-temporal analysis of behavior (B). N = 10-11 animals/group. * indicates $p < 0.05$. One-Way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

Fig. 3. Effects of *status epilepticus* and treadmill exercise in object recognition. The task was performed on P57 and P58. Data show train section (A) short-term memory test (B) and long-term memory test (C). N = 10-11 animals/group. * indicates $p < 0.05$ between different objects in the same group (A and A'-B-C); different letters indicates $p < 0.05$ differences in the discrimination index between different groups. One-Way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test.

Fig. 4. Effects of *status epilepticus* and treadmill exercise in elevated plus maze. The task was performed on P60. Data show time spent in the open arms (A); number of entries in the open arms (B); and number of risk assessment (C). N = 10-11 animals/group.

Table 1. Total number of Fluoro-Jade B-positive neurons

Group	Brain structures					
	CA1 hippocampal subfield			Perirhinal cortex		
	1 day	3 days	7 days	1 day	3 days	7 days
Control	NF	NF	NF	NF	NF	NF
SE	74.7 ^{**} ± 7.6	35.1 [*] ± 11.8	32.4 [*] ± 11.2	25.7 ^{**} ± 5.1	7.8 [*] ± 0.9	8.0 [*] ± 2.0

N = 4-7 animals/group. NF = Not found. * indicates $p < 0.05$; ** indicates $p < 0.01$ between SE groups in the different time evaluated and the respective control. One-Way ANOVA followed by Tukey post test.

Table 2. Effects of status epilepticus and treadmill exercise on spatial distribution of exploratory activity in open field task

Group	Time along the vicinity (%)	Distance along the vicinity (%)	Stops along the vicinity
Control	93.9 ± 1.2	84.7 ± 2.0	72.2 ± 5.6
Exercised	91.1 ± 2.0	78.5 ± 2.3	77.3 ± 6.8
SE	90.1 ± 2.5	81.7 ± 3.4	74.0 ± 7.9
SE+Exercised	87.6 ± 2.0	79.4 ± 2.7	81.0 ± 8.0

Data are expressed as mean±S.E.M of percentages of time along the vicinity, distance along the vicinity and the number of stops along the vicinity of the apparatus wall. N = 10-11 animals/group.

Figure 1.

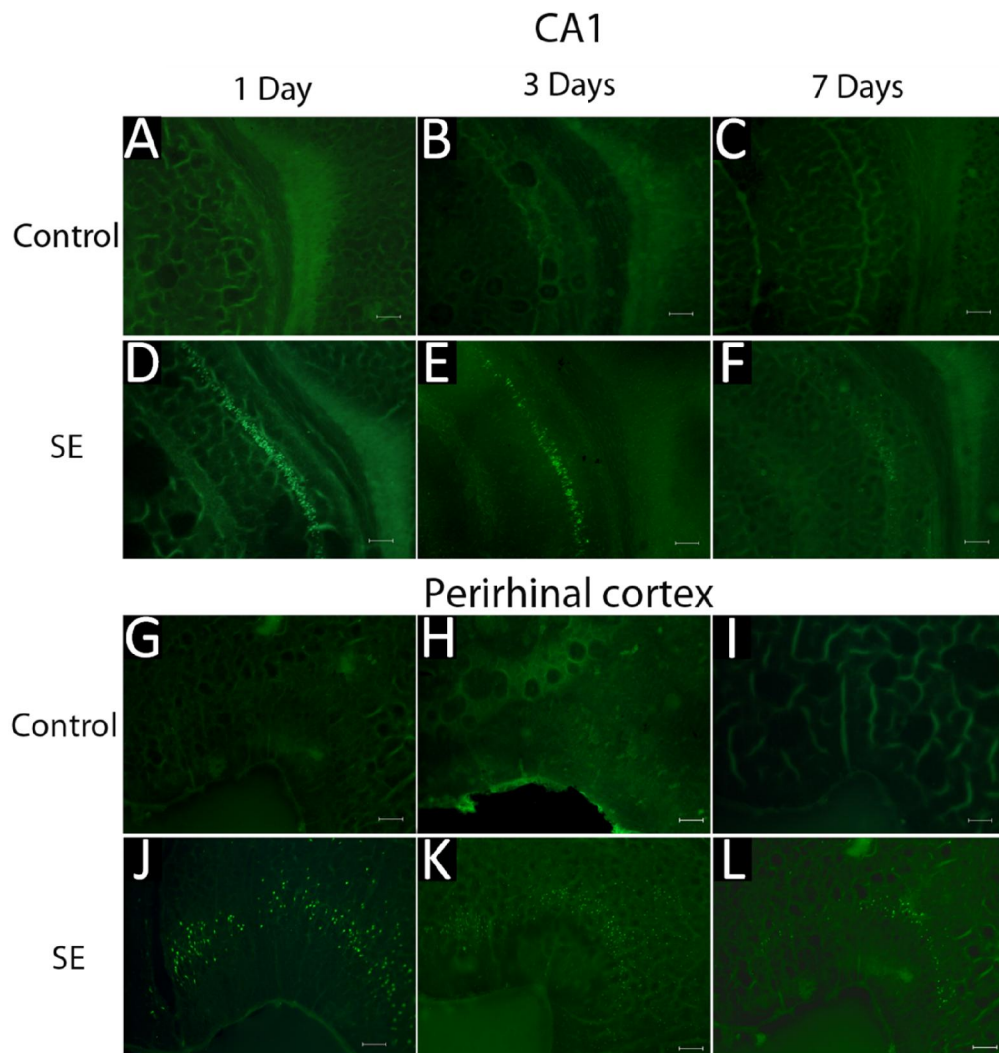


Figure 2.

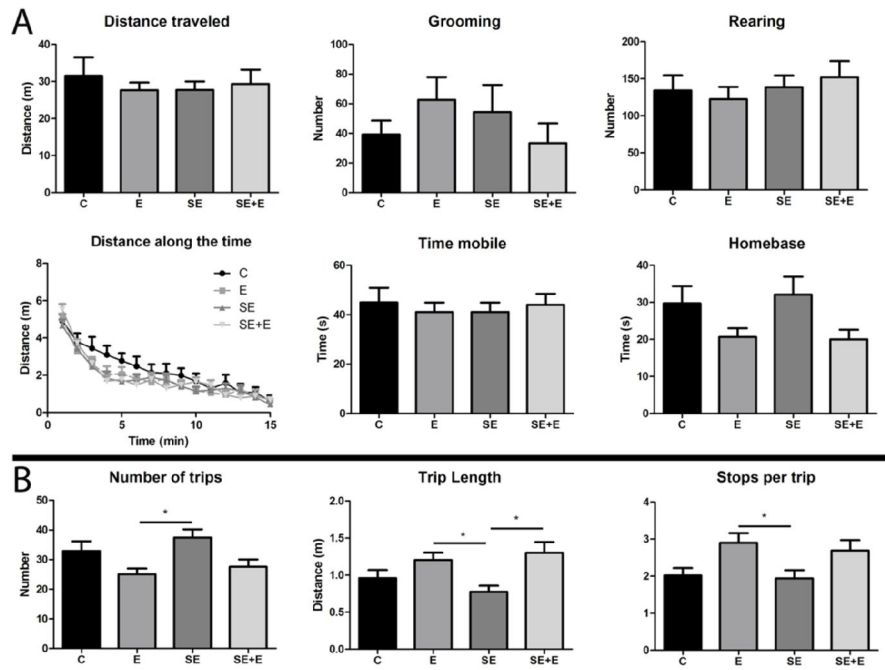


Figure 3.

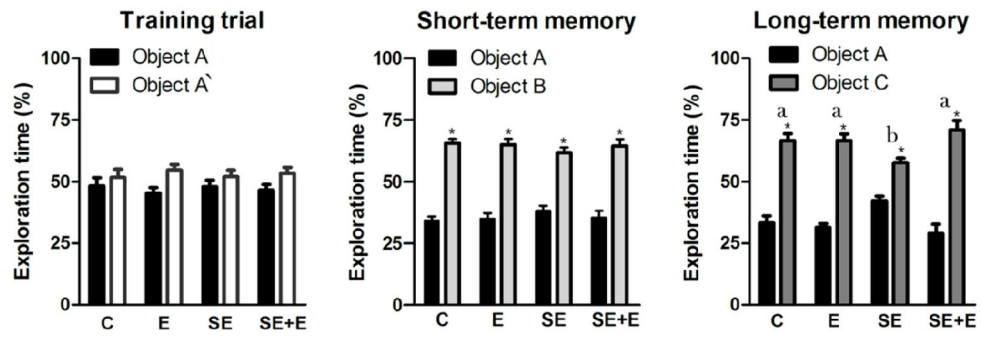
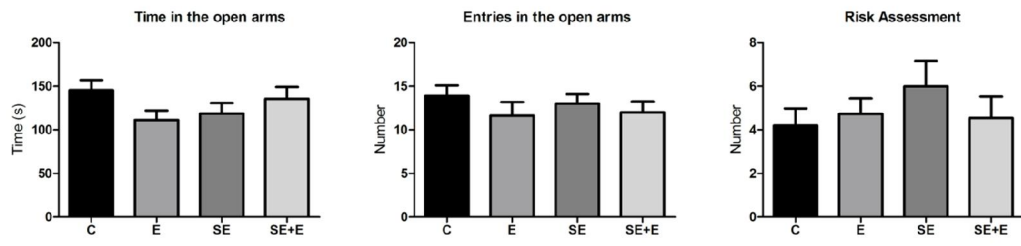


Figure 4.

Parte III. DISCUSSÃO

Indivíduos que apresentam SE na infância podem apresentar alterações comportamentais e cognitivas na vida adulta, desenvolvimento de epilepsia, podendo levar a morte [66, 67]. Diversos estudos observaram alterações cognitivas e comportamentais em ratos adultos que sofreram SE durante períodos críticos do desenvolvimento cerebral [25, 68-70]. Além disso, crises convulsivas de longa duração durante a infância podem resultar em déficit cognitivo em diferentes tarefas comportamentais na vida adulta [71, 72]. O período latente após o insulto é um momento fundamental, no qual intervenções apropriadas podem reverter ou modificar as alterações decorrentes do SE. No entanto, o tratamento com medicamentos antiepilépticos como fenitoína e carbamazepina não foi capaz de prevenir ou alterar as anormalidades cognitivas e comportamentais geradas pelo SE [73, 74].

O exercício físico pode influenciar a fisiologia cerebral e as funções cognitivas tanto em humanos quanto em modelos animais. Diferentes protocolos de exercício vêm sendo utilizados na prevenção e no tratamento de déficit de memória decorrente de diversos fatores como envelhecimento [75, 76], administração de morfina [77] e exposição pré-natal ao etanol [78]. Além disso, o exercício físico é capaz de induzir neurogênese [79-82] e melhorar as funções cognitivas [83-85]. Considerando as evidências descritas, neste estudo investigamos os possíveis benefícios gerados por um protocolo de exercício físico de baixa intensidade na reversão das alterações cognitivas em ratos adultos que sofreram SE em períodos iniciais do desenvolvimento (P16).

Na primeira parte deste trabalho, demonstramos que o SE induzido por LiCl-pilocarpina na infância leva a uma expressiva perda neuronal na região CA1 do hipocampo e no córtex perihinal até 7 dias após a convulsão (Fig. 1).

Embora o cérebro imaturo seja relativamente mais resistente a alterações morfológicas causadas por convulsões [86], alguns trabalhos evidenciaram que o SE pode causar neurodegeneração massiva em regiões como tálamo e hipocampo em ratos jovens [71, 87]. Wang et al. [25] demonstraram que a administração de pilocarpina em ratos adultos promove morte neuronal em diversas áreas cerebrais até 14 dias após a convulsão, com densa distribuição no córtex e no hipocampo. Em adição, Druga et al. [88] induziram SE em ratos de 12 dias de vida pós-natal, e observaram neurodegeneração em diferentes regiões cerebrais.

Na segunda parte deste estudo, após identificar a neurodegeneração derivada da indução do SE, investigamos os efeitos do SE, induzido em períodos iniciais da vida (P16), e do treinamento físico em tarefas comportamentais na idade adulta em ratos. Animais submetidos ao SE apresentaram déficit significativo na memória de longa duração na tarefa de reconhecimento de objetos (Fig. 3), indicando que convulsões prolongadas em períodos iniciais do desenvolvimento podem causar prejuízos cognitivos a longo prazo. Diversos estudos têm demonstrado que a indução do SE em períodos iniciais da vida gera um efeito negativo em diferentes testes comportamentais de memória, como no labirinto aquático de Morris e na tarefa de esQUIVA inibitória [71, 89], embora os mecanismos que levem a este déficit não estejam completamente elucidados. A neurodegeneração observada no grupo SE (Fig. 1) pode estar relacionado com o déficit cognitivo observado nos animais submetidos ao SE, considerando que estudos demonstram que a integridade do córtex perihinal é crítica para o memória de reconhecimento em ratos. Animais com lesão no córtex perihinal apresentam um comprometimento significativo no reconhecimento de objetos 24h após a sessão de treino quando

comparados com animais controle que não sofreram lesão [90]. Apesar da importância do córtex perirrinal na formação da memória de reconhecimento, a participação do hipocampo neste processo não pode ser desconsiderada, tendo em vista a existência de interações anatômicas e funcionais entre essas duas estruturas através de conexões diretas ou via córtex entorrinal [91-94].

Nos animais em que após a indução do SE foram submetidos ao protocolo de exercício de baixa intensidade em esteira o déficit na memória de reconhecimento foi revertido completamente quando comparado com os animais do grupo SE (Fig. 3). Embora tenha sido demonstrado por diferentes autores que o exercício físico é capaz de reverter o dano causado por insultos ao SNC [95, 96], protocolos de exercício *per se* não alteram parâmetros cognitivos [97, 98]. Assim como nesses trabalhos, em nosso estudo o exercício *per se* não gerou alterações cognitivas nos animais treinados. Nossos resultados indicam que o exercício físico de baixa intensidade pode reverter os danos na memória de reconhecimento avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos, que foi prejudicada por uma convulsão de longa duração na infância.

Na tarefa de campo aberto nenhum dos grupos avaliados (controle, exercitado, SE e SE+exercitado) apresentou alterações relacionadas à atividade motora. No entanto, a organização espacial se mostrou alterada entre os animais do grupo SE, quando comparado aos grupos exercitado e SE+exercitado. Esse resultado sugere que o protocolo de exercício de baixa intensidade em esteira reverte a alteração observada na organização espacial demonstrada por ratos que sofreram a administração de LiCl-pilocarpina.

Na tarefa de labirinto em cruz elevado, os animais dos diferentes grupos não apresentaram diferença no comportamento relacionado aos níveis de

ansiedade. Este resultado está de acordo com dados encontrados por Salim et al. [99], que mostraram que ratos submetidos a um protocolo de exercício de intensidade moderada por 4 semanas (30-60 min/dia) não apresentam alteração nos níveis de ansiedade. Por outro lado, Fulk et al. [100] demonstraram que um treinamento físico de intensidade moderada durante dez semanas (45 min/dia, 5 vezes/semana) reduziu os níveis de ansiedade na tarefa de labirinto em cruz elevado. Resultados da literatura indicam que diferentes protocolos de exercício e diferentes períodos de treinamento resultam em alterações na influência do exercício sobre o comportamento indicativo de ansiedade no labirinto em cruz elevado.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o SE durante períodos iniciais do desenvolvimento (P16) resulta em degeneração neuronal até, pelo menos, 7 dias após a convulsão. Além disso, ratos tratados com LiCl-pilocarpina na infância apresentaram um comprometimento significativo na memória de longa duração na tarefa de reconhecimento de objetos, sendo que esta alteração foi revertida nos animais que foram expostos ao protocolo de exercício de baixa intensidade. Nossos resultados sugerem que o exercício físico pode ser utilizado como uma alternativa, bem como terapia não farmacológica complementar para pacientes que sofreram SE durante a infância.

Parte IV. PERSPECTIVAS

Considerado que o SE apresenta uma grande incidência em crianças e que este distúrbio pode gerar alterações comportamentais e em alguns casos levar ao desenvolvimento de epilepsia, torna-se relevante avaliar diferentes abordagens que visem minimizar ou reverter tais efeitos. Em nosso trabalho, observamos que o exercício se mostrou eficaz em reverter o déficit cognitivo no modelo de SE induzido por LiCl-pilocarpina, podendo ser utilizado como terapia complementar não farmacológica. Neste sentido, torna-se interessante investigar as alterações geradas pelo exercício físico no SNC de ratos que sofreram SE em períodos iniciais do desenvolvimento. Como perspectivas, pretendemos avaliar os efeitos do exercício físico com diferentes intensidades e frequências sobre alterações morfológicas, tais como o surgimento de novos neurônios, a identificação da natureza neuroquímica destes neurônios (ação inibitória ou excitatória), bem como avaliar possíveis alterações na morfologia glial, na captação e na liberação de glutamato em hipocampo e córtex de ratos. Pretendemos também investigar os efeitos do exercício físico nos transportadores de glutamato em córtex e em hipocampo após a administração de LiCl-pilocarpina.

Parte V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Engel J. Intractable epilepsy: definition and neurobiology. *Epilepsia* 2001;42 Suppl 6: 3.
- [2] Nabbout R, Dulac O. Epileptic syndromes in infancy and childhood. *Curr Opin Neurol* 2008;21: 161-6.
- [3] Elger C, Schmidt D. Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy Behav* 2008;12: 501-39.
- [4] Sidenvall R, Forsgren L, Blomquist H, Heijbel J. A community-based prospective incidence study of epileptic seizures in children. *Acta Paediatr* 1993;82: 60-5.
- [5] Stephen LJ, Brodie MJ. Epilepsy in elderly people. *Lancet* 2000;355: 1441-6.
- [6] Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. *Epilepsia* 1991;32: 429-45.
- [7] Cowan LD. The epidemiology of the epilepsies in children. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002;8: 171-81.
- [8] Waaler PE, Blom BH, Skeidsvoll H, Mykletun A. Prevalence, classification, and severity of epilepsy in children in western Norway. *Epilepsia* 2000;41: 802-10.
- [9] Berg AT, Shinnar S, Levy SR, Testa FM. Newly diagnosed epilepsy in children: presentation at diagnosis. *Epilepsia* 1999;40: 445-52.
- [10] Sillanpää M. Long-term outcome of epilepsy. *Epileptic Disord* 2000;2: 79-88.
- [11] Engel JJ, Williamson PD, Wieser HG. Mesial temporal lobe epilepsy. In: Engel JJ, Pedley TA, editors. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia Lippincott-Raven; 1997.
- [12] McNamara JO. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci* 1994;14: 3413-25.
- [13] MEYER A, FALCONER MA, BECK E. Pathological findings in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1954;17: 276-85.
- [14] Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res* 2002;135: 237-51.
- [15] Mathern GW, Pretorius JK, Babb TL. Influence of the type of initial precipitating injury and at what age it occurs on course and outcome in patients with temporal lobe seizures. *J Neurosurg* 1995;82: 220-7.
- [16] VanLandingham KE, Heinz ER, Cavazos JE, Lewis DV. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann Neurol* 1998;43: 413-26.

- [17] Rakhade SN, Jensen FE. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol* 2009;5: 380-91.
- [18] Sankar R, Rho JM. Do seizures affect the developing brain? Lessons from the laboratory. *J Child Neurol* 2007;22: 21S-9S.
- [19] van Esch A, Ramlal IR, van Steensel-Moll HA, Steyerberg EW, Derksen-Lubsen G. Outcome after febrile status epilepticus. *Dev Med Child Neurol* 1996;38: 19-24.
- [20] Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983;9: 315-35.
- [21] Arida R, Scorza F, Scorza C, Cavalheiro E. Is physical activity beneficial for recovery in temporal lobe epilepsy? Evidences from animal studies. *Neurosci Biobehav Rev* 2009;33: 422-31.
- [22] McDonough JH, Shih TM. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21: 559-79.
- [23] Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 1987;23: 953-68.
- [24] Hirsch E, Baram T, Snead Or. Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res* 1992;583: 120-6.
- [25] Wang L, Liu YH, Huang YG, Chen LW. Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. *Brain Res* 2008;1241: 157-67.
- [26] Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 2008;172: 143-57.
- [27] Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res* 2002;50: 93-103.
- [28] Dishman RK, Berthoud HR, Booth FW, Cotman CW, Edgerton VR, Fleshner MR, Gandevia SC, Gomez-Pinilla F, Greenwood BN, Hillman CH, Kramer AF, Levin BE, Moran TH, Russo-Neustadt AA, Salamone JD, Van Hoomissen JD, Wade CE, York DA, Zigmond MJ. Neurobiology of exercise. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14: 345-56.
- [29] Myers J. Cardiology patient pages. Exercise and cardiovascular health. *Circulation* 2003;107: e2-5.
- [30] Goldstein LB. Physical activity and the risk of stroke. *Expert Rev Neurother* 2010;10: 1263-5.

- [31] Hayes C, Herbert M, Marrero D, Martins CL, Muchnick S. Diabetes and exercise. *Diabetes Educ* 2008;34: 37-40.
- [32] Peirce NS. Diabetes and exercise. *Br J Sports Med* 1999;33: 161-72; quiz 172-3, 222.
- [33] Sibley BA, Etnier JL. The Relationship Between Physical Activity and Cognition in Children: A Meta-Analysis. *Pediatric Exercise Science* 2003;15: 243–256.
- [34] Hillman CH, Snook EM, Jerome GJ. Acute cardiovascular exercise and executive control function. *Int J Psychophysiol* 2003;48: 307-14.
- [35] Winter B, Breitenstein C, Mooren FC, Voelker K, Fobker M, Lechtermann A, Krueger K, Fromme A, Korsukewitz C, Floel A, Knecht S. High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem* 2007;87: 597-609.
- [36] Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104: 5638-43.
- [37] Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci* 2008;9: 58-65.
- [38] Lautenschlager NT, Almeida OP. Physical activity and cognition in old age. *Curr Opin Psychiatry* 2006;19: 190-3.
- [39] Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 2007;30: 464-72.
- [40] Dik M, Deeg DJ, Visser M, Jonker C. Early life physical activity and cognition at old age. *J Clin Exp Neuropsychol* 2003;25: 643-53.
- [41] Koopman R, van Loon LJ. Aging, exercise, and muscle protein metabolism. *J Appl Physiol* 2009;106: 2040-8.
- [42] Schwartz AL. Fatigue mediates the effects of exercise on quality of life. *Qual Life Res* 1999;8: 529-38.
- [43] Willenheimer R, Erhardt L, Cline C, Rydberg E, Israelsson B. Exercise training in heart failure improves quality of life and exercise capacity. *Eur Heart J* 1998;19: 774-81.
- [44] Basaran S, Guler-Uysal F, Ergen N, Seydaoglu G, Bingol-Karakoç G, Ufuk Altintas D. Effects of physical exercise on quality of life, exercise capacity and pulmonary function in children with asthma. *J Rehabil Med* 2006;38: 130-5.
- [45] Cadmus L, Patrick MB, Maciejewski ML, Topolski T, Belza B, Patrick DL. Community-based aquatic exercise and quality of life in persons with osteoarthritis. *Med Sci Sports Exerc* 2010;42: 8-15.

- [46] Santana-Sosa E, Barriopedro MI, López-Mojares LM, Pérez M, Lucia A. Exercise training is beneficial for Alzheimer's patients. *Int J Sports Med* 2008;29: 845-50.
- [47] Radak Z, Hart N, Sarga L, Koltai E, Atalay M, Ohno H, Boldogh I. Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010;20: 777-83.
- [48] Hackney ME, Earhart GM. Health-related quality of life and alternative forms of exercise in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15: 644-8.
- [49] Tanaka K, Quadros AC, Santos RF, Stella F, Gobbi LT, Gobbi S. Benefits of physical exercise on executive functions in older people with Parkinson's disease. *Brain Cogn* 2009;69: 435-41.
- [50] Leasure JL, Jones M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience* 2008;156: 456-65.
- [51] Yuede CM, Zimmerman SD, Dong H, Kling MJ, Bero AW, Holtzman DM, Timson BF, Csernansky JG. Effects of voluntary and forced exercise on plaque deposition, hippocampal volume, and behavior in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2009;35: 426-32.
- [52] van Praag H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Med* 2008;10: 128-40.
- [53] Liu YF, Chen HI, Yu L, Kuo YM, Wu FS, Chuang JI, Liao PC, Jen CJ. Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 2008;90: 81-9.
- [54] O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res* 2007;176: 362-6.
- [55] Kim YP, Kim HB, Jang MH, Lim BV, Kim YJ, Kim H, Kim SS, Kim EH, Kim CJ. Magnitude- and time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Int J Sports Med* 2003;24: 114-7.
- [56] Arida R, Cavalheiro E, da Silva A, Scorza F. Physical activity and epilepsy: proven and predicted benefits. *Sports Med* 2008;38: 607-15.
- [57] Howard GM, Radloff M, Sevier TL. Epilepsy and sports participation. *Curr Sports Med Rep* 2004;3: 15-9.
- [58] Nakken KO. [Should people with epilepsy exercise?]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2000;120: 3051-3.
- [59] Sirven JI, Varrato J. Physical activity and epilepsy: what are the rules? *Phys Sportsmed* 1999;27: 63-70.

- [60] Arida RM, Scorza FA, Gomes da Silva S, Schachter SC, Cavalheiro EA. The potential role of physical exercise in the treatment of epilepsy. *Epilepsy Behav* 2010;17: 432-5.
- [61] Arida RM, de Jesus Vieira A, Cavalheiro EA. Effect of physical exercise on kindling development. *Epilepsy Res* 1998;30: 127-32.
- [62] Arida RM, Scorza FA, dos Santos NF, Peres CA, Cavalheiro EA. Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res* 1999;37: 45-52.
- [63] Arida R, Sanabria E, da Silva A, Faria L, Scorza F, Cavalheiro E. Physical training reverts hippocampal electrophysiological changes in rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. *Physiol Behav* 2004;83: 165-71.
- [64] van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96: 13427-31.
- [65] Rambo LM, Ribeiro LR, Oliveira MS, Furian AF, Lima FD, Souza MA, Silva LF, Retamoso LT, Corte CL, Puntel GO, de Avila DS, Soares FA, Figuera MR, Mello CF, Royes LF. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurochem Int* 2009;55: 333-40.
- [66] Kwong KL, Chang K, Lam SY. Features predicting adverse outcomes of status epilepticus in childhood. *Hong Kong Med J* 2004;10: 156-9.
- [67] Barnard C, Wirrell E. Does status epilepticus in children cause developmental deterioration and exacerbation of epilepsy? *J Child Neurol* 1999;14: 787-94.
- [68] Fabene PF, Merigo F, Galiè M, Benati D, Bernardi P, Farace P, Nicolato E, Marzola P, Sbarbati A. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats involves ischemic and excitotoxic mechanisms. *PLoS One* 2007;2: e1105.
- [69] Kaindl AM, Ikonomidou C. Glutamate antagonists are neurotoxins for the developing brain. *Neurotox Res* 2007;11: 203-18.
- [70] Borges K, McDermott D, Irier H, Smith Y, Dingleline R. Degeneration and proliferation of astrocytes in the mouse dentate gyrus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp Neurol* 2006;201: 416-27.
- [71] de Oliveira DL, Fischer A, Jorge RS, da Silva MC, Leite M, Gonçalves CA, Quillfeldt JA, Souza DO, e Souza TM, Wofchuk S. Effects of early-life LiCl-pilocarpine-induced status epilepticus on memory and anxiety in adult rats are associated with mossy fiber sprouting and elevated CSF S100B protein. *Epilepsia* 2008;49: 842-52.
- [72] Kubová H, Mares P, Suchomelová L, Brozek G, Druga R, Pitkänen A. Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur J Neurosci* 2004;19: 3255-65.

- [73] Temkin NR. Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. *Epilepsia* 2009;50 Suppl 2: 10-3.
- [74] Temkin NR, Jarell AD, Anderson GD. Antiepileptogenic agents: how close are we? *Drugs* 2001;61: 1045-55.
- [75] van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 2005;25: 8680-5.
- [76] Garza AA, Ha TG, Garcia C, Chen MJ, Russo-Neustadt AA. Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;77: 209-20.
- [77] Alaei H, Borjeian L, Azizi M, Orian S, Pourshanzari A, Hanninen O. Treadmill running reverses retention deficit induced by morphine. *Eur J Pharmacol* 2006;536: 138-41.
- [78] Christie BR, Swann SE, Fox CJ, Froc D, Lieblich SE, Redila V, Webber A. Voluntary exercise rescues deficits in spatial memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. *Eur J Neurosci* 2005;21: 1719-26.
- [79] Ang ET, Wong PT, Moochhala S, Ng YK. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience* 2003;118: 335-45.
- [80] Arida R, Scorza C, Scorza F, Gomes da Silva S, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Cavalheiro E. Effects of different types of physical exercise on the staining of parvalbumin-positive neurons in the hippocampal formation of rats with epilepsy. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31: 814-22.
- [81] Bjørnebekk A, Mathé AA, Brené S. The antidepressant effect of running is associated with increased hippocampal cell proliferation. *Int J Neuropsychopharmacol* 2005;8: 357-68.
- [82] Creer DJ, Romberg C, Saksida LM, van Praag H, Bussey TJ. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107: 2367-72.
- [83] Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience* 2010;167: 588-97.
- [84] Chae CH, Jung SL, An SH, Park BY, Wang SW, Cho IH, Cho JY, Kim HT. Treadmill exercise improves cognitive function and facilitates nerve growth factor signaling by activating mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase1/2 in the streptozotocin-induced diabetic rat hippocampus. *Neuroscience* 2009;164: 1665-73.
- [85] Griffin EW, Bechara RG, Birch AM, Kelly AM. Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism. *Hippocampus* 2009;19: 973-80.

- [86] Haas KZ, Sperber EF, Opanashuk LA, Stanton PK, Moshé SL. Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. *Hippocampus* 2001;11: 615-25.
- [87] Sankar R, Shin DH, Liu H, Mazarati A, Pereira de Vasconcelos A, Wasterlain CG. Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci* 1998;18: 8382-93.
- [88] Druga R, Mares P, Kubová H. Time course of neuronal damage in the hippocampus following lithium-pilocarpine status epilepticus in 12-day-old rats. *Brain Res* 2010;1355: 174-9.
- [89] Liu ZW, Zhang T, Yang Z. Involvement of nitric oxide in spatial memory deficits in status epilepticus rats. *Neurochem Res* 2007;32: 1875-83.
- [90] Winters BD, Forwood SE, Cowell RA, Saksida LM, Bussey TJ. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *J Neurosci* 2004;24: 5901-8.
- [91] Yukie M. Connections between the medial temporal cortex and the CA1 subfield of the hippocampal formation in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *J Comp Neurol* 2000;423: 282-98.
- [92] Burwell RD, Amaral DG. Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J Comp Neurol* 1998;398: 179-205.
- [93] Burwell RD, Amaral DG. Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J Comp Neurol* 1998;391: 293-321.
- [94] Deacon TW, Eichenbaum H, Rosenberg P, Eckmann KW. Afferent connections of the perirhinal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 1983;220: 168-90.
- [95] Ferrer-Alcon M, Winkler-Hirt C, Madani R, Perrin FE, Kato AC. Low intensity exercise attenuates disease progression and stimulates cell proliferation in the spinal cord of a mouse model with progressive motor neuronopathy. *Neuroscience* 2008;152: 291-5.
- [96] Gobbo OL, O'Mara SM. Exercise, but not environmental enrichment, improves learning after kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in association with an increase in brain-derived neurotrophic factor. *Behav Brain Res* 2005;159: 21-6.
- [97] Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cienc* 2008;80: 301-9.
- [98] Barnes CA, Forster MJ, Fleshner M, Ahanotu EN, Laudenslager ML, Mazzeo RS, Maier SF, Lal H. Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody response in aged F-344 rats. *Neurobiol Aging* 1991;12: 47-53.

[99] Salim S, Sarraj N, Taneja M, Saha K, Tejada-Simon MV, Chugh G. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behav Brain Res* 2010;208: 545-52.

[100] Fulk LJ, Stock HS, Lynn A, Marshall J, Wilson MA, Hand GA. Chronic physical exercise reduces anxiety-like behavior in rats. *Int J Sports Med* 2004;25: 78-82.