RAPHAEL AFONSO DE MATOS

**EFEITOS DA MELATONINA PINEAL SOBRE A NEUROGÊNESE DE RATOS
SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

RAPHAEL AFONSO DE MATOS

**EFEITOS DA MELATONINA PINEAL SOBRE A NEUROGÊNESE DE RATOS
SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Matos, Raphael Afonso de.

Efeitos da melatonina pineal sobre a neurogênese de ratos submetidos ao treinamento físico aeróbio / Raphael Afonso de Matos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Neurofisiologia.

Versão do título para o inglês: Effects of pineal melatonin on neurogenesis in rats submitted to aerobic training.

1. Glândula pineal 2. Melatonina 3. Exercício Físico 4. Neurogênese
I. Cipolla Neto, Prof. Dr. José II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0174/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Raphael Afonso de Matos.

Título da Dissertação: Efeitos da melatonina pineal sobre a neurogênese de ratos submetidos ao treinamento físico aeróbio.

Orientador(a): Prof. Dr. José Cipolla Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Decl. CEUA.042/2012.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 199/11/CEUA, datado de 24.01.12 e por solicitação do Prof. Dr. **José Cipolla Neto**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Raphael Afonso de Matos** ao Projeto de Pesquisa "*O papel da melatonina no controle do metabolismo energético: ações centrais e a regulação circadiana da função metabólica*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 15 de agosto de 2012.

P/ *W. T. Lima*

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e pelas portas que se abriram no meu caminho.

Ao meu pai por sempre incentivar minhas atividades intelectuais.

A minha mãe, grande mulher que amo incondicionalmente.

Minhas amadas irmãs, Amanda e Fernanda.

Meu avô Artur, exemplo de homem.

Minha tão amada e doce avó Maria Amélia, fatalmente me emocionei ao escrever essa singela frase...não há palavras para descrever o quanto sou grato. Te amo.

Um anjinho de olhos azuis que surgiu na minha vida, minha sobrinha Alice.

Minha segunda família, os Fachini. Roberto, Edna, Fernando, Amabili e minha amada namorada e futura esposa Thaizi.

Aos meus queridos amigos Jéssica, Sinésio, Carol, Livia, Fernanda, Julieta e Aninha.

Ao pessoal da Farmacologia, professora Carol, Léo, Nilton, Juca, Dielly e Guiomar.

Ao homem que durante minha graduação chamei de professor e hoje tenho a honra de chamá-lo de amigo, Ronaldo Melo.

Ao meu orientador professor José Cipolla Neto, por abrir as portas do laboratório, pelo carinho e pela oportunidade de aprender e fazer ciência.

*"E aqueles que foram vistos dançando
foram julgados insanos por aqueles que
não podiam escutar a música ."*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

MATOS, R. A. Efeitos da melatonina pineal sobre a neurogênese de ratos submetidos ao treinamento físico aeróbio. 2014. 53 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A melatonina é um hormônio produzido principalmente pela glândula pineal e possui caráter temporizador do meio interno, atuando como sinalizador circadiano e sazonal em inúmeras espécies. Este hormônio também possui poderosa ação antioxidante, neuroprotetora e neurotrófica. Além da melatonina, outro fator que age significativamente nos processos de neuroproteção e neurotrofismo é o exercício físico, este por sua vez pode ser um grande aliado de baixo custo e fácil manipulação no combate ao declínio cognitivo e aumento da plasticidade cerebral, como já demonstrado em diversos estudos. Sabe-se que o treinamento físico é responsável por alterar diversos parâmetros metabólicos nos animais, e trabalhos do nosso grupo demonstraram que tais adaptações metabólicas em ratos dependem da presença de melatonina pineal. Diante disso decidimos investigar se as adaptações neuroplásticas observadas em ratos submetidos à realização de treinamento físico também estariam relacionadas à presença deste neuro-hormônio. Nossos resultados demonstram que a ausência de melatonina pineal não exerceu influência na expressão gênica e quantificação proteica de indicadores da neurogênese, somente a realização do treinamento físico foi capaz de alterar alguns dos parâmetros avaliados. Os níveis de corticosterona se mostraram alterados nos animais que não possuíam produção de melatonina pineal e a avaliação da expressão gênica circadiana com oito pontos ao longo das 24 horas nos revelou o comportamento variável do mRNA de algumas proteínas atreladas ao processo de plasticidade hipocampal.

Palavras-chave: Glândula pineal. Melatonina. Treinamento Físico. Neurogênese.

ABSTRACT

MATOS, R. A. **Effects of pineal melatonin on neurogenesis in rats submitted to aerobic training.** 2014. 53 p. Masters thesis (Human Physiology) -Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2014.

Melatonin is a hormone produced mainly by the pineal gland and has character timer of the internal medium, acting as flag circadian and seasonal in many species. This hormone also has powerful antioxidant action, neuroprotective and neurotrophic. In addition to the melatonin, another factor that acts significantly in processes of neuroprotection and neurotrofismo is physical exercise, this in turn can be a great ally of low cost and easy handling in the fight against cognitive decline and increase in cerebral plasticity, as already demonstrated in several studies. It is known that the physical training is responsible for change several metabolic parameters in animals, and work by our group have shown that such metabolic adaptations in rats depends on the presence of melatonin pineal gland. So we decided to investigate whether the neuroplastic adaptations observed in rats submitted to physical training also would be related to the presence of this neurohormone. Our results demonstrate that the absence of pineal melatonin did not have any influence on the gene expression and protein quantity indicators of neurogenesis, only the physical training was able to change some of the parameters assessed. . The levels of corticosterone were altered in animals that did not have production of pineal melatonin and the assessment of gene expression circadian with eight points along the 24 hours has revealed to us the variable behavior of the mRNA of some proteins linked to the process of hippocampal plasticity.

Keywords: Pineal Gland. Melatonin. Physical Training. Neurogenesis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Glândula Pineal e Melatonina	10
1.2 Melatonina e Neurogênese	14
1.3 Exercício Físico e Neurogênese.....	16
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVO	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Animais.....	22
4.2 Pinealectomia	22
4.3 Reposição Sistêmica de Melatonina	23
4.4 Treinamento Físico	23
4.5 Determinação do peso corporal dos animais.....	24
4.6 Eutanásia dos animais	24
4.7 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em Tempo Real	24
4.8 Extração proteica e immunoblotting	26
4.9 Dosagem de corticosterona plasmática.....	27
4.10 Análise dos resultados	27
5 RESULTADOS	29
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glândula Pineal e Melatonina

Durante muitos anos a glândula pineal (ou órgão pineal) foi apontada apenas como um órgão vestigial sem função específica. No século XVII a mesma chegou a ser descrita por René Descartes como a estrutura responsável por ser distribuidora dos fluidos do cérebro para os músculos. Em 1958 o dermatologista Aaron Lerner identificou e isolou a melatonina, hormônio produzido pela pineal. (ARENDT, 1995).

A origem embriológica da glândula pineal se dá como uma evaginação dorsal do teto do III ventrículo (EKSTROM; MEISSEL, 2003). Trata-se de uma pequena estrutura epitalâmica localizada dorsalmente à região caudal do diencéfalo, composta por tecido glandular que possui células características denominadas pinealócitos. Em roedores, a pineal não é diretamente fotossensível e possui três porções distintas: a pineal profunda, o pedúnculo pineal e a pineal superficial (MOLLER, 1992) (**Figura 1**).

Figura 1. Localização anatômica da glândula pineal de rato apresentando suas três porções distintas: pineal superficial, pedúnculo pineal e pineal profunda. Modificado de Swanson, L. W. 1998.

A via neural de controle da síntese de melatonina tem início nos núcleos paraventriculares hipotalâmicos (NPV) que estabelece conexão com a coluna

intermediolateral da medula espinhal (IML) e daí, através de neurônios pré-ganglionares simpáticos, projeta-se sobre os gânglios cervicais superiores (GCS), de onde se originam os neurônios pós-ganglionares simpáticos responsáveis por inervar a glândula pineal (P). Esta via neural é temporizada pelo núcleo supraquiasmático (NSQ) do hipotálamo que através de sinalização glutamatérgica e gabaérgica controla a atividade neural circadiana dessa via e, consequentemente, da produção de melatonina. Assim, a síntese de melatonina se dá exclusivamente à noite devido à sincronização do NSQ ao ciclo de luminosidade ambiental, cuja informação é transmitida pela via retino-hipotalâmica. (**Figura 2**).

Figura 2. Representação esquemática da via de sinalização neural da síntese de melatonina em rato. NSQ: núcleo supraquiasmático; NPV: núcleo paraventricular; IML: coluna intermediolateral; GCS: gânglio cervical superior; P: glândula pineal (Adaptado de Cipolla – Neto e Afeche, 2008).

A liberação de noradrenalina no interstício pineal e sua interação com os receptores adrenérgicos β_1 e α_1 , inicia a síntese e secreção da melatonina. Este hormônio está envolvido na regulação de diversas e importantes funções no organismo de inúmeras espécies. Pelo fato de a melatonina ser produzida e secretada na fase noturna, de forma rítmica e consistente, tem o papel de sincronizador dos ritmos circadianos ou cronobiótico (REITER, 1991). Questões como período reprodutivo, ciclo atividade/repouso, sono/vigília e atividade do sistema imunológico estão atrelados aos ritmos secretórios desta indolamina (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 1999). A produção de melatonina varia com a duração do dia e da noite de tal forma que, noites mais longas (características do inverno) acarretam uma maior duração no tempo de secreção deste neuro-hormônio, enquanto que, ao contrário, noites mais curtas

(características do verão) acarretam uma menor duração no seu período secretório. Essa característica funcional do sistema neural de controle da produção de melatonina pineal faz com que esse hormônio, adicionalmente, exerça o importante papel de um sincronizador sazonal para diversas funções críticas à sobrevivência do indivíduo e da espécie (REITER, 1993) (**Figura 3**).

Figura 3. Representação esquemática da informação fotoperiódica transmitida pela síntese de melatonina em duas estações do ano, mostrando suas variações circadiana (A) e sazonal (B) (Adaptado de Cipolla – Neto e Afeche, 2008).

A síntese de melatonina na glândula pineal envolve um conjunto de reações enzimáticas que tem início com a hidroxilação do aminoácido triptofano, o qual é o precursor básico para produção do hormônio (KLEIN et al., 1997). Essa conversão a 5-hidroxitriptofano é feita pela enzima triptofano hidroxilase (TPH). O 5-hidroxitriptofano por sua vez, passa por uma descarboxilação (por uma descarboxilase inespecífica) resultando na formação de serotonina. Posteriormente, a serotonina sofre a ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) sendo convertida em N-acetilserotonina. Finalmente o grupamento hidroxila da N-acetilserotonina é trocado por um metil pela ação da enzima hidroxindol-oxi-metiltransferase (HIOMT), dando origem a melatonina (CIPOLLA-NETO et al., 1999) (**Figura 4**). A melatonina produzida é imediatamente liberada uma vez que, graças a suas características de solubilidade (anfifilicidade devido a presença dos grupamentos

metoxi no carbono 5 e acetil, ligado ao nitrogênio do grupo amina) ela não é armazenada em vesículas no citoplasma dos pinealócitos.

Figura 4. Via bioquímica com os precursores e o local de atuação das enzimas envolvidas na síntese de melatonina. TPH: triptofano hidroxilase; AANAT: arilalquilamina-N-acetiltransferase; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase. (Adaptado de Cipolla – Neto e Afeche, 2008).

A melatonina possui poderosa função antioxidante, uma vez que os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico apresentam capacidade redutora (CARPENTIERI et al., 2012; CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008) (**Figura 5**). Além da ação direta, a melatonina exerce seus efeitos através da interação com receptores de membrana específicos de alta afinidade, MT1 e MT2, ambos atuando em associação à proteína G (REPPERT et al., 1996). Uma vez que a melatonina pode cruzar membranas celulares livremente, pode também atuar através da sua ligação a receptores nucleares da classe dos receptores órfãos do ácido retinóico, RZR-ROR, subtipos α e β (CARDINALI et al., 1997; CARLBERG et al., 1995). É importante salientar que os receptores para a melatonina estão presentes em mais de 110 regiões do encéfalo e em diversas estruturas periféricas (VANECEK, 1998).

Figura 5. Esquema representativo da molécula de melatonina com destaque em vermelho para os grupamentos metoxi e amina (anfifilicidade) e em azul para os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico (antioxidante) (Adaptado de Cipolla – Neto e Afeche, 2008).

A vida média da melatonina circulante é de aproximadamente 20 minutos em ratos, e a metabolização periférica de 90% desta ocorre principalmente pela transformação hepática em 6-hidroximelatonina que após conjugação com sulfatos ou com glucoronídeos é eliminada na urina. (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008).

1.2 Melatonina e Neurogênese

Um dos aspectos para a manutenção da saúde cognitiva de um organismo é a sua capacidade de neurogênese (MANDA et al., 2008). Entende-se por neurogênese o processo que se inicia por meio das células tronco neurais (CTNs), seguido por sua diferenciação, maturação e uma possível integração a circuitos já existentes (KEMPERMANN, 2010). Este processo ocorre basicamente em duas regiões do encéfalo, a zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais e a zona subgranular (ZSG) do giro denteado do hipocampo (GAGE, 2000; GOULD et al., 1999). A regulação da neurogênese adulta pode ser influenciada pela ritmicidade circadiana e privação do sono (RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2009), bem como pela fragmentação deste (MUELLER et al., 2011). Os níveis de alguns hormônios e fatores de crescimento também podem influenciar a proliferação e diferenciação das células tronco neurais sob condições fisiológicas e patológicas (SOTTHIBUNDHU et al., 2010).

Uma série de observações coloca a melatonina como molécula que poderia desempenhar um importante papel na regulação da neurogênese no cérebro adulto

(RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2009, 2011). Uma dessas observações é o fato deste hormônio modular a função de CTNs incluindo proliferação e diferenciação dessas em tecido cerebral embrionário (SOTTHIBUNDHU et al., 2010), aumentando a viabilidade e facilitando a diferenciação destas em neurônios e em menor proporção em astrócitos. Fato que pode ocorrer em razão do aumento da expressão de neurotrofinas (KONG et al., 2008). Faz-se importante também destacar o poderoso caráter antioxidante da melatonina, uma vez que nos últimos anos evidências demonstram que quantidades elevadas de radicais livres bem como uma deficiência de mecanismos antioxidantes são fatores que contribuem para problemas neurocognitivos e neurodegenerativos em razão do aumento da apoptose celular hipocampal decorrente do estresse oxidativo, com consequente implicação no processo de neurogênese (MANDA; REITER, 2010).

Rennie et al. (2009), constataram que a pinealectomia (retirada da glândula pineal superficial) causava um decréscimo do número de neurônios piramidais no hipocampo de ratos adultos. Tal fato era revertido após a reposição de melatonina na água de beber dos animais. Da mesma forma, Crupi et al. (2011) relataram o fato de a suplementação de melatonina estimular o nascimento, sobrevivência e diferenciação de novos neurônios no giro denteado hipocampal de ratas ovariectomizadas, além de colaborar para maturação de espinhos dendríticos e complexidade da árvore dendrítica dos novos neurônios, facilitando assim, sua integração a circuitos pré-existentis (BENITEZ-KIN et al., 2006). O mesmo foi observado com a administração intraperitoneal em ratos (8 mg/kg) da indolamina em questão, aumentando a polimerização dos microtúbulos e o volume total da camada de células granulares hipocampais (RAMIREZ-RODRIGUEZ et al., 2011). Animais submetidos à irradiação craniana sofrem uma diminuição significativa do número de células no giro denteado hipocampal, entretanto observou-se que a administração de melatonina intraperitoneal realizada anteriormente a este procedimento, acarretava uma maior expressão de marcadores de proliferação celular e diferenciação neuronal na região, reforçando a neuroproteção promovida por este hormônio (MANDA et al., 2008).

Camundongos com um modelo de isquemia, obtiveram melhoras neurológicas significativas após a suplementação de melatonina, além do aumento de células neuronais (KILIC et al., 2008). A proliferação e diferenciação celular no encéfalo de roedores decorrente da presença de melatonina se deve a ativação dos receptores MT1 e MT2, encontrados principalmente nas CTNs das áreas neurogênicas do cérebro adulto, sendo que a presença de luzindol (antagonista dos receptores de melatonina), inibe os efeitos neurogênicos

e plásticos no encéfalo de roedores (KIM et al., 2007; KONG et al., 2008; MORIYA et al., 2007; SOTTHIBUNDHU et al., 2010). Por outro lado, a presença de agomelatina (agonista dos receptores MT1 e MT2) é capaz de promover neurogênese hipocampal e acarreta uma elevação nos níveis da proteína Bdnf (Fator neurotrófico derivado do cérebro) (SOUMIER, 2009).

A N-acetilserotonina (NAS), precursora da melatonina (**Figura 4**), está relacionada com a ativação dos receptores TrkB (mesmo receptor de Bdnf) na região hipocampal. Essa ativação promove neurogênese em ratos tratados com essa substância e é suprimida quando ocorre o bloqueio destes receptores (SOMPOL, 2011). Todos esses dados apontam para a crescente importância da pineal e da melatonina nos processos de neurogênese e neuroproteção.

1.3 Exercício Físico e Neurogênese

Sabe-se que a atividade física realizada de forma regular, está associada a inúmeros benefícios ao praticante, como a redução do peso corporal, redução da glicemia, melhora nos níveis de colesterol e pressão arterial, aumento da densidade mineral óssea, aumento da força muscular e otimização das funções cardíaca e respiratória. Entretanto, ao se demonstrar que o exercício físico praticado regularmente promove neurogênese hipocampal em mamíferos adultos, a visão em torno da importância da atividade física mudou significativamente. Surpreendentemente o exercício não somente atua na melhora de funções metabólicas, mas também no que diz respeito a otimização de funções neurais (FABEL; KEMPERMANN, 2008; VAN PRAAG et al., 1999).

Foi observado que além do exercício físico aumentar o número de células neuronais, ele também possui influência sobre a morfologia destas, o que leva a crer que os benefícios da atividade física regular sobre estas novas células podem ter caráter qualitativo (VAN PRAAG, 2008). Sugere-se que o sistema nervoso dos mamíferos permaneça sujeito à ação dos benefícios acarretados pelo exercício físico por pelo menos 75% do tempo de vida total deste, o que significa um período considerável para retardar ou prevenir déficits cognitivos (BLACKMORE et al., 2009).

O hipocampo é uma área do cérebro relacionada aos processos de aprendizado e memória, esta estrutura sofre significativas alterações quando o indivíduo é submetido ao treinamento físico regular, independente da modalidade deste (KANNAGARA et al., 2009) A

geração de novas células granulares nessa estrutura continua ocorrendo após o nascimento e durante toda a vida (BRANDT et al., 2010). Observa-se considerável proliferação neuronal em ratos submetidos ao exercício físico aeróbico (VAN PRAAG, 2008), a corrida voluntária ou em esteira tem se mostrado um poderoso estimulante para induzir proliferação celular no giro denteado hipocampal destes animais (LAFENÊTRI et al., 2010).

Itoh et al. (2011), investigaram se o exercício físico aeróbico era capaz de estimular a proliferação celular no encéfalo de ratos que sofreram lesões traumáticas. Surpreendentemente os animais treinados apresentaram um aumento significativo de células Ki-67 positivas (marcador de proliferação celular) e Nestina positivas (marcador de neurônios imaturos) ao redor da área danificada em comparação com o grupo não treinado em um período de três e sete dias de exercício. Esses efeitos benéficos promovidos pelo treinamento físico sobre a plasticidade neural e função cognitiva podem ser mediados em parte por um incremento na vasculatura do encéfalo, bem como do fluxo sanguíneo neste tecido (VAN DER BORGHT et al., 2009), o que certamente promove um transporte de nutrientes, oxigênio e neurotrofinas otimizados (CLARK et al., 2009).

Dentre essas neurotrofinas, é importante destacar a molécula conhecida como fator neurotrófico derivado do cérebro (Bdnf). Esta é a principal neurotrofina do sistema nervoso central e parece estar diretamente envolvida nos efeitos benéficos proporcionados pelo exercício físico, como sobrevivência neuronal e neurogênese (BERCHTOLD et al., 2005; COTMAN; BERCHTOLD, 2002; LISTA; SORRENTINO, 2010). Seu precursor, o pró-Bdnf, é convertido na sua forma ativa pela ação de proteases extracelulares como a plasmina (HASHIMOTO, 2010; PANG et al., 2004). Segundo Cotman e Berchtold (2002), o Bdnf exerce ações tanto pós- quanto pré-sinápticas, causando alterações na liberação de neurotransmissores no elemento pré-sináptico e modificando a sensibilidade no elemento pós-sináptico, além de aumentar a resistência neuronal a lesões. Estas alterações ocorrem mediante ativação dos receptores do tipo TrkB (receptor tirosina cinase B). Demonstra-se, também, que alterações nos níveis de Bdnf acarretam problemas de aprendizagem e memória (LINNARSON et al., 1997), fato este que pode ser revertido quando Bdnf exógeno é administrado em roedores (COTMAN; BERCHTOLD, 2007), reforçando a importância desta neurotrofina nos processos aqui discutidos. Estes benefícios parecem se estender também à prole dos animais treinados, como foi observado por Lee et al., (2006) no qual ratas foram submetidas a natação durante o período gestacional. Neste trabalho foi constatado que a prole

destes animais apresentava uma maior expressão gênica de Bdnf e um número maior de células em processo de proliferação na região hipocampal.

Contudo, outros fatores parecem ter sua contribuição nos processos plásticos neurais. Dentre eles vale destacar o fator de crescimento derivado do endotélio (Vegf), o fator de crescimento semelhante a insulina (Igf-1) e o próprio hormônio do crescimento (GH) (BLACKMORE et al., 2009).

O Vegf (fator de crescimento endotelial vascular) é uma proteína angiogênica, capaz também de exercer efeito neurogênico e neuroprotetor (JIN et al., 2002), tendo como seu principal fator desencadeante a hipóxia tecidual (SHARKEY et al., 2000). Diversos outros fatores parecem estar envolvidos na liberação de Vegf, como hormônios e citocinas. Palmer et al. (2000), propuseram que esta proteína estaria envolvida com a neurogênese, quando observaram que as novas células presentes no giro denteado do hipocampo se encontravam extremamente próximas aos vasos sanguíneos.

As ações exercidas por essa proteína se dá por meio da interação com receptores do tipo tirosina cinase denominados VegfR1 (DE VRIES et al., 1992; SHIBUYA; CLAEISSON-WELSH, 2006), VegfR2 (TERMAN et al., 1992) e VegfR3 (KAIPAINEN et al., 1995). Estudos demonstram que a maior expressão deste agente trófico na região hipocampal acarreta uma maior proliferação celular e melhora das funções cognitivas (CAO et al., 2004), provavelmente pela ativação dos receptores VegfR2, como foi observado por Louissaint et al. (2002) no qual o bloqueio desses receptores foi realizado em aves canoras e observou-se uma redução da neurogênese e angiogênese no encéfalo destes animais, independente da presença do fator neurotrófico derivado do cérebro. Em outro estudo, Fabel et al. (2003), afirmaram que a neurogênese advinda da prática de exercícios físicos em camundongos é dependente de Vegf, sendo este fundamental para que as mudanças plásticas ocorram na região hipocampal dos animais submetidos a roda de corrida voluntária.

Com relação à intensidade com o qual o exercício físico deve ser praticado para que obtenhamos os maiores benefícios, Lou et al. (2008) citam que atividades de baixa e média intensidade acarretam uma maior expressão gênica de fatores neurotróficos, como o Bdnf e o Vegf em roedores quando comparados ao exercício extenuante. É importante salientar que atividades de alta intensidade acarretam uma maior liberação de glicocorticóides, e o hipocampo é uma região do encéfalo extremamente vulnerável ao estresse, em razão, principalmente, do grande número de receptores para este hormônio encontrados nesta

estrutura (PICKERING et al., 2006). Contudo a elevação dos níveis de corticosterona em roedores acontece mesmo em atividades físicas de baixa intensidade, fato que não suprime o efeito neurogênico da mesma, o que leva a crer que o exercício físico exerce um efeito protetor contra a ação da corticosterona no encéfalo (KANNAGARA et al., 2009). Em um estudo de 2008, Wu e colaboradores investigaram a proliferação, maturação e sobrevivência dos novos neurônios surgidos em roedores após sessões de treinamento em esteira, e concluíram que a neurogênese não parece ter relação com os níveis de corticosterona presentes no animal treinado. Provavelmente isto ocorra em razão do exercício físico causar um decréscimo no número de receptores de glicocorticóides no hipocampo destes animais (PARK et al., 2005).

Jin et al. (2008) submeteram camundongos fêmeas ovariectomizadas ao exercício físico aeróbio e observaram que apesar da proliferação celular no giro denteado hipocampal ter sido menor em condições de privação de estrogênio com relação ao grupo controle, notou-se um incremento significativo em comparação ao grupo sedentário. Sugerindo que o exercício físico pode ser utilizado na intenção de obter melhoras no âmbito cognitivo em mulheres no climatério.

Os efeitos decorrentes do exercício físico sobre o giro denteado de roedores pode ser observado 24 horas após a primeira sessão de treinamento. Entretanto, a detecção dos efeitos mais pronunciados se dá apenas após 3 dias de atividade física (VAN PRAAG et al., 1999). Esta afirmação é corroborada pelo estudo de Ferreira et al. (2011) uma vez que foi observado neurogênese hipocampal significativa em ratos após 3, 7 e 15 dias de exercício físico em esteira, com maior expressão de marcadores de proliferação e diferenciação celular, porém, não foi observada uma maior expressão gênica do fator neurotrófico derivado de cérebro (Bdnf). Uda et al., 2006 utilizou um protocolo de 7 dias de treino e observou um aumento significativo do número de células expressando marcadores de neurogênese, bem como uma integração destas aos circuitos neuronais.

Portanto, o exercício físico parece mobilizar uma cascata de eventos moleculares que culmina na formação de novas células neuronais na região do hipocampo, com consequente aumento da plasticidade sináptica e melhora nos processos de aprendizagem e memória (COTMAN; BERCHTOLD, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

Trabalhos do nosso grupo demonstram que as adaptações metabólicas induzidas pelo exercício físico aeróbio em ratos são dependentes da presença de melatonina pineal (BORGES-SILVA et al., 2005, 2007). Ainda dados preliminares indicam que o exercício físico aeróbio aumenta a síntese de melatonina, além do fato de a melatonina, como visto acima ser um importante agente neurotrófico e neuroprotetor e que sua diminuição ou ausência acarreta déficit de células neuronais no hipocampo. Diante disso, propomos com este trabalho, avaliar se as adaptações neuroplásticas que, sabidamente, ocorrem após a realização da atividade física regular, são, de alguma forma, dependentes da presença desta indolamina.

3 OBJETIVO

O presente projeto tem como principal objetivo verificar se a neurogênese hipocampal em ratos promovida pelo exercício físico em esteira está relacionada com a presença de melatonina pineal. Também avaliaremos a expressão gênica circadiana de proteínas envolvidas no processo de neurogênese.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Os animais utilizados para experimentação são ratos albinos da linhagem Wistar, do biotério de criação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), sendo alojados no biotério do Laboratório de Neurobiologia em caixas individuais (30x20x13 cm), uma vez que a interação social possui implicações diretas no processo de neurogênese. As condições de temperatura foram controladas (23 ± 2 °C) sob o ciclo de iluminação claro / escuro, 12 / 12 h com água e ração (Nuvital®, São Paulo, SP, Brasil) *ad libitum*. Os animais foram divididos em 6 grupos distintos, com 8 animais por grupo: 1) ratos controles sedentários (CS); 2) ratos controle treinados (CT); 3) ratos pinealectomizados sedentários (PS); 4) ratos pinealectomizados treinados (PT); 5) ratos pinealectomizados sedentários tratados com melatonina (PSM); 6) ratos pinealectomizados treinados tratados com melatonina (PTM). Houve ainda um outro grupo que não sofreu nenhum tipo de intervenção, e foi mantido nas mesmas condições com água e comida *ad libitum*.

4.2 Pinealectomia

Ao completarem sete semanas de vida, alguns ratos foram submetidos a pinealectomia. Esta foi executada sob anestesia intraperitoneal (1,7 ml de Cloridrato de Xilazina mais 5 ml de Ketamina na dosagem de 1,5 ml de solução por 100g de peso do animal). O procedimento cirúrgico envolveu a fixação da cabeça em suporte para cirurgia estereotáxica e a pinealectomia foi efetuada mediante a abertura mediana do escalpo, com exposição da sutura lambdóide. Neste local foi feita uma trepanação da calota craniana seguida de uma perfuração circular do osso, retirada do disco ósseo, e extração da glândula pineal logo abaixo do seio venoso (HOFFMAN; REITER, 1965). Em seguida o disco ósseo foi recolocado e o escalpo suturado.

4.3 Reposição Sistêmica de Melatonina

A reposição de melatonina (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA) foi realizada por via oral, na dosagem de 0,5 mg/kg de peso do animal, administrada na água que os mesmos ingeriram durante a fase escura do período circadiano. A reposição teve início na noite seguinte à pinealectomia e perdurou até a noite anterior ao sacrifício. A diluição inicial foi realizada em 40 µL de etanol absoluto, adicionando 960 µL de água para um volume final de 1 mL. Esta solução mãe foi, depois diluída no volume de água estimadamente ingerido, dia a dia, pelos animais. Os bebedouros com melatonina foram colocados imediatamente antes da mudança do claro para o escuro e retirados imediatamente depois do acender das luzes. Durante a fase clara os animais receberam uma solução veículo preparada com 40 µL de etanol absoluto dissolvido em 100 mL de água. Experimentos anteriores do nosso laboratório indicam que essa concentração de melatonina resulta em uma concentração plasmática de aproximadamente 200 a 300 pg/mL, número que está próximo dos valores de pico diários fisiológicos (100 – 200 pg/mL).

4.4 Treinamento Físico

Duas semanas após a pinealectomia, os animais dos grupos correspondentes foram submetidos ao protocolo de exercício físico em esteira rolante (Imbramed, mod. K3000, São Paulo, SP, Brasil), adaptada para ratos. O protocolo utilizado foi o mesmo realizado por Itoh et al. (2011) e Uda et al. (2006), onde, para minimizar o estresse todos os ratos foram familiarizados com a corrida em esteira por 7 dias consecutivos, durante 15 min./dia, à uma velocidade de 15m/min. Após a adaptação, os ratos foram separados, aleatoriamente, nos grupos previamente citados. Os animais que realizaram o treinamento, foram submetidos a sessões na esteira por 7 dias consecutivos, durante 30 min./dia, á uma velocidade de 22 m/min. Os animais cujos grupos não foram submetidos ao treinamento, foram colocados na esteira ergométrica desligada por 7 dias consecutivos, durante 30 min./dia, o protocolo não incluiu alterações de inclinação na esteira. Tendo em vista o fato de que atraso ou adiantamento de fase pode ocorrer no animal em razão da mudança do pico de secreção de melatonina decorrente do exercício físico (BUXTON et al., 1997), o treinamento foi realizado em horários aleatórios para que o mesmo não se tornasse um *zeitgeber*, porém essa

aleatoriedade deu-se sempre no escotoperíodo, uma vez que a espécie em estudo sabidamente possui atividade noturna.

4.5 Determinação do peso corporal dos animais

Todos os animais foram pesados em balança digital semanalmente, durante todo o período experimental, para acompanhamento e para cálculo da dosagem de reposição de melatonina nos grupos correspondentes.

4.6 Eutanásia dos animais

Os seis grupos de animais citados previamente (CS, CT, PS, PT, PSM e PTM) foram eutanasiados por decapitação no ZT 18 (pico de produção de melatonina) 24 horas após a última sessão de treinamento, o outro grupo que não sofreu nenhuma intervenção teve seus animais eutanasiados nos diferentes ZTs ao longo das 24 horas. Os tecidos de interesse foram retirados para os testes biológicos.

4.7 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em Tempo Real

As amostras de tecidos (hipocampo) foram homogeneizadas em Trizol[®] usando-se um Polytron (Kinematica, Nova Iorque, NY, EUA) até a completa solubilização. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio em cada amostra sendo, em seguida, agitadas de 2 em 2 minutos até completar 10 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C, formando-se, assim, três fases:

1) a superior, aquosa e incolor (RNA); 2) a intermediária, esbranquiçada (DNA); 3) a inferior, orgânica que contém o clorofórmio. A primeira fase, que contém o RNA total, foi transferida para outro tubo e adicionou-se 0,5 mL de álcool isopropanol, que precipitou o RNA total. As amostras foram agitadas periodicamente até completar 15 minutos, e posteriormente centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos a 4 °C formando-se um *pellet*. Descartando-se o sobrenadante, foi acrescentado 1 mL de etanol gelado a 75% e centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Descartando-se novamente o sobrenadante, o *pellet* foi seco à temperatura ambiente e, em seguida, diluído em água DEPC e estocado a -80 °C. O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

Para o procedimento de transcrição reversa utilizou-se o Kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Nova Iorque, NY, EUA) que consiste na síntese do cDNA a partir de 5 µg de RNA total. Para cada reação utilizou-se: 1 µL de dNTPs (0,5mM cada), 1 µL de Random Primer, 5 µg de RNA total e água estéril para completar um volume final de 12 µL, que foi incubado por 5 minutos a 70 °C e em seguida por 10 minutos a 25 °C. No período de incubação a 25 °C foi adicionado 8µL de Mix da enzima que é composto por: 4 µL de tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), 2 µL de DTT, 1 µL da enzima transcriptase reversa e 1 µL de água estéril. A reação, portanto, ficou com volume final de 20 µL e foi incubada por 70 minutos a 42 °C seguida de aquecimento à 70 °C por 15 minutos para desnaturação da enzima.

A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada através da técnica de PCR em tempo real utilizando o aparelho 7500 Real-Time PCR System[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata utilizando 2 µL de cDNA (20 ng) previamente sintetizado, que foram adicionados à mistura da reação contendo 12,5 µL de *Power SYBR*[®] Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 8,5 µL de água MilliQ e 10 µM dos *primers* específicos para cada gene (**Tabela 1**).

Os parâmetros de amplificação foram os seguintes: 1) etapa inicial de ativação da enzima a 50 °C por 1 minuto e 95 °C por 10 minutos, 2) 40 ciclos que incluíram a desnaturação a 95 °C por 15 segundos; o anelamento dos *primers* e a extensão a 60 °C por 1 minuto 3) 1 ciclo para análise do *melting* que consiste em 95 °C por 15 segundos; 60 °C por 1 minuto e posterior aumento gradativo da temperatura para 95 °C para obtenção das curvas de *melting*.

O limiar para desconsideração do ruído na fluorescência de cada amostra foi determinado automaticamente pelo software 7500 versão 2.0.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Tabela 1 – Sequência de *primers* utilizados.

<i>Primer</i>	<i>N° de Acesso</i>	<i>Sequências</i>	<i>Frag.</i>
<i>Dcx</i>	NM_053379.3	5'-AGCAAATCCCATGTTGTCCCA-3' 5'-TTCAACAGTCCTCATGCCCA-3'	98bp
<i>Ki-67</i>	NM_139186.2	5'-GGGAGGACTCGCAGTTTGAG-3' 5'-AACGCTCTCTGAAAGCCACA-3'	129bp
<i>Bdnf</i>	NM_001270630.1	5'-CACTTTTGAGCACGTGATCGA-3' 5'-AGAAGGTTTCGGCCCAACG-3'	59bp
<i>Vegf</i>	NM_031836.2	5'-GAGGAAAGGGAAAGGGTCAAA-3' 5'-AATCCTGGAGCGTTCACGTGTG-3'	69bp
<i>Beta-actina</i>	NM_031144	5'-CTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3' 5'-AAGACCTCTATGCCAACACAGTG-3'	97bp
<i>Gama-actina</i>	NM_001127449	5'-TACCCTATTGAGCACGGCAT-3' 5'-CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT-3'	80bp
<i>Rpl37a</i>	NM_001108801	5'-CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG-3' 5'-GCCACTGTTTTTCATGCAGGAAC-3'	93bp

Nessa tabela estão listados os *primers* utilizados, desenhados a partir das informações obtidas pela Genbank™ (NCBI – NIH, Bethesda, EUA), sendo informados também a sequência sense e antisense, além do tamanho dos fragmentos (Frag.) amplificados.

4.8 Extração proteica e immunoblotting

O tecido (hipocampo) foi submetido à homogeneização em 3 ml de tampão de extração constituído de Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml. Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm a 4 °C por 20 minutos para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo proteico quantificado utilizando o reagente de Bradford (*Bio-Rad*®, Phyladelphia, PA, EUA). As amostras foram tratadas com tampão de Laemmli, acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 5:1 (v:v) e 50 a 100 µg de proteína total foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida, em cada gel havia como padrão um marcador de peso

molecular com valores estabelecidos. A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose através de um aparelho semi-dry (*Bio-Rad*[®], Phyladelphia, PA, EUA) por 75 minutos a 15 V, porém no tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a eluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (LiCor, Lincoln, NE, EUA) a 4 °C durante a noite. Estas membranas foram então incubadas com o anticorpo primário anti-DCX (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EUA) na concentração de 1:1000 por 4 horas a temperatura ambiente e em seguida lavada com solução basal (Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%), por 30 minutos. As membranas foram então incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fluoróforo 800 anti-rabbit e 600 anti-mouse (LiCor, Lincoln, NE, EUA) na concentração de 1:10.000 por 2 horas a temperatura ambiente, em caixa escura. A intensidade das bandas nas membranas foi determinada e quantificada através do scanner Odyssey (LiCor, Lincoln, NE, EUA).

4.9 Dosagem de corticosterona plasmática

Os animais eutanasiados por decapitação tiveram seu sangue coletado e centrifugado a 1000g por 15 minutos a 4°C para separação do plasma. Este por sua vez foi guardado em eppendorfs à temperatura de -80°C. Posteriormente, preparou-se uma curva padrão e as amostras foram diluídas (1:30) para a realização da dosagem de corticosterona por kit de ELISA (Caiman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA), seguindo o protocolo determinado pelo fabricante. Leu-se a absorbância em 405 nm no Synergy 2 Bio-Tek (Winooski, VT, EUA). Calculou-se a absorbância média (duplicatas das amostras) e a partir da curva padrão obtivemos a concentração do hormônio de interesse.

4.10 Análise dos resultados

A análise da expressão gênica (PCR em tempo real) foi realizada utilizando-se o método $2^{-\Delta CT}$. A avaliação estatística nos seis diferentes grupos experimentais foi realizada por análise de variância bifatorial (two-way ANOVA), e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni, prefixando-se o nível de significância em 95% ($p < 0,05$). Na análise circadiana, a avaliação estatística foi realizada por análise de variância unifatorial (one-way ANOVA), da mesma forma, as eventuais diferenças encontradas foram avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni prefixando-se o mesmo nível de significância. Os

valores foram representados como média $\pm$ erro padrão. Os testes estatísticos foram realizados mediante o programa GraphPad Prism, v.5.0.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos até então demonstraram que o exercício físico foi um fator capaz de modificar a expressão gênica de dois dos quatro genes analisados. A melatonina não teve influência sobre a expressão gênica destes. A **Figura 6** demonstra a expressão gênica de *Bdnf* no ZT 18. Pode-se notar um aumento significativo da expressão deste gene nos animais que realizaram o treinamento físico. A melatonina não influenciou os níveis de mRNA de *Bdnf*.

Figura 6 – Expressão gênica do Fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*) no hipocampo dos animais.

Expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*) ($n=8$). Significância ** Treinados vs Sedentários ($p < 0,05$). Avaliação estatística realizada por análise de variância bifatorial (two-way ANOVA) e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. Fonte: Do próprio autor.

Com relação à expressão gênica de *Vegf* no ZT 18, após a análise dos dados observou-se que os animais treinados não diferem dos animais sedentários, tampouco a melatonina influenciou os níveis de mRNA desta proteína (**Figura 7**).

Figura 7 – Expressão gênica do Fator de crescimento derivado do endotélio (Vegf) no hipocampo dos animais.

Expressão gênica do fator de crescimento derivado do endotélio (*Vegf*) ($n=8$). Avaliação estatística realizada por análise de variância bifatorial (two-way ANOVA) e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. Fonte: Do próprio autor.

Outro gene analisado foi o Ki-67. Notou-se que no ZT 18 não houve diferenças significativas nem entre os grupos treinados e sedentários, e nem com relação à ausência de melatonina (**Figura 8**).

Figura 8 – Expressão gênica de *Ki-67* no hipocampo dos animais.

Expressão gênica de *Ki-67* ($n=8$). Avaliação estatística realizada por análise de variância bifatorial (two-way ANOVA) e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. Fonte: Do próprio autor.

Após a análise da expressão gênica de *Dcx* no ZT 18, foi observada uma menor expressão de mRNA nos animais treinados com relação aos animais sedentários. A ausência de melatonina não influenciou a expressão gênica desta proteína (**Figura 9**). Na quantificação proteica de *Dcx* por Western blot, observamos uma tendência a maior presença desta proteína nos animais submetidos ao treinamento físico, entretanto, não obtivemos diferença estatística significativa entre os grupos (**Figura 10**).

Figura 9 – Expressão gênica de *Dcx* no hipocampo dos animais.

Expressão gênica de *Dcx* ($n=8$). Significância * Treinados vs Sedentários ($p < 0,05$). Avaliação estatística realizada por análise de variância bifatorial (two-way ANOVA) e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. Fonte: Do próprio autor.

Figura 10 – Quantificação da proteína Dcx no hipocampo dos animais.

Quantificação proteica de Dcx (n= 4 a 5). Avaliação estatística realizada por análise de variância bifatorial (two-way ANOVA) e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores são mostrados como média ± erro padrão. Fonte: Do próprio autor.

Foi realizada a dosagem de corticosterona plasmática nos grupos estudados. Observamos níveis plasmáticos condizentes com o período em questão (ZT 18) somente nos grupos controle treinado e controle sedentário, os animais pinealectomizados (mesmo os que realizaram a reposição de melatonina via oral) não apresentaram secreção de corticosterona neste ponto (**Figura 11**).

Figura 11 – Dosagem de corticosterona plasmática dos animais.

Níveis de corticosterona plasmática ($n = 5$). Significância * Sedentários PINX e PINX/MEL vs respectivo Controle. # Treinados PINX e PINX/MEL vs respectivo Controle ($p < 0,05$). Avaliação estatística realizada por análise de variância bifatorial (two-way ANOVA) e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. Fonte: Do próprio autor.

Com relação a expressão gênica circadiana das proteínas estudadas, foi realizada a coleta dos hipocampus de animais que não sofreram nenhuma intervenção em oito diferentes pontos (Zts 03, 06, 09, 12, 15, 18, 21 e 24) na intenção de observar o comportamento do mRNA destes fatores ao longo do dia.

Não foi observada diferença estatística ao longo das 24 horas na flutuação do mRNA da proteína Bdnf (**Figura 12**).

Figura 12 – Expressão gênica circadiana de Bdnf.

Expressão gênica circadiana de Bdnf ($n = 3$ a 5). Avaliação estatística realizada por análise de variância fatorial (one-way ANOVA) e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. Fonte: Do próprio autor.

Com relação a expressão gênica circadiana de Vegf, observamos diferença estatística entre pontos ao longo das 24 horas (**Figura 13**), além desta se encaixar na análise Cosinor, conferindo ritmicidade ao gene analisado (**Tabela 2**).

Figura 13 – Expressão gênica circadiana de Vegf.

Expressão gênica circadiana de Vegf ($n = 3$ a 5). Significância * vs ZT 6. Significância # vs ZT 9 ($p < 0,05$). Avaliação estatística realizada por análise de variância fatorial (one-way ANOVA) e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão.

Fonte: Do próprio autor

Tabela 2 – Valores da análise Cosinor para expressão gênica circadiana de Vegf.

<i>Vegf</i>	p =	Amplitude	Acrofase	Mesor
	0,004	0,01 $\pm$	18,01 $\pm$	0,02 $\pm$
		0,00	0,36	0,00

Fonte: Do próprio autor.

Já o mRNA da proteína Ki67 também não demonstrou variação estatística ao longo das 24 horas (**Figura 14**).

Figura 14 – Expressão gênica circadiana de Ki67.

Expressão gênica circadiana de Ki67 ($n= 3$ a 5). Avaliação estatística realizada por análise de variância fatorial (one-way ANOVA) e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. Fonte: Do próprio autor.

Observamos diferença estatística ao longo das 24 horas em um ponto na expressão gênica de Dcx (**Figura 15**).

Figura 15 – Expressão gênica circadiana de Dcx.

Expressão gênica circadiana de Dcx ($n= 3$ a 5). Significância * vs ZT 18 ($p < 0,05$). Avaliação estatística realizada por análise de variância fatorial (one-way ANOVA) e as eventuais diferenças encontradas avaliadas pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores são mostrados como média $\pm$ erro padrão. Fonte: Do próprio autor.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi investigada a influência da melatonina pineal sobre a neurogênese em ratos Wistar submetidos ao treinamento físico aeróbio realizado em esteira. Foi observado que a ausência desta indolamina não parece afetar a expressão gênica dos fatores neurotróficos Bdnf e Vegf, assim como também não foram observadas mudanças relacionadas à ausência de melatonina pineal sobre a expressão gênica das proteínas Dcx e Ki-67. Somente a realização de atividade física pelos grupos correspondentes foi capaz de alterar a expressão gênica de Bdnf e Dcx, fato que não se repetiu com as proteínas Ki-67 e Vegf. A realização da técnica de Western blot para a proteína Dcx também não mostrou diferenças significativas entre os grupos, diferentemente da dosagem de corticosterona, onde foram observados níveis distintos entre os animais controle de ambos os grupos (sedentários e treinados) com relação aos animais pinealectomizados, mesmo naqueles onde foi realizada a reposição via oral de melatonina na água de beber. Foi estudada também a expressão gênica circadiana das proteínas citadas acima, observou-se que apenas duas delas possuem variação ao longo do período de 24 horas, sendo uma dotada de ritmicidade circadiana (Vegf). As outras duas não demonstraram variação significativa dentro de oito pontos do período circadiano.

A expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (Bdnf) dos animais treinados mostrou-se elevada com relação aos animais sedentários, este dado corrobora diversos estudos que apontam que a realização de atividade física é capaz de incrementar os níveis desta neurotrofina no sistema nervoso central (AMBROGINI et al., 2013; ALOMARI et al., 2013; GRIFFIN et al., 2009) promovendo plasticidade e otimizando funções cognitivas (COTMAN; BERCHTOLD, 2007; LINNARSON et al., 1997; LISTA; SORRENTINO, 2010). A ausência de melatonina não teve influência sobre a expressão gênica desta neurotrofina. Vale ressaltar que alguns estudos demonstram que a N-acetilserotonina (NAS), precursora da melatonina, pode atuar sobre os receptores de Bdnf, os chamados receptores TrkB (JANG et al., 2010; SOMPOL et al., 2011), mediando ações como neuroproteção e proliferação celular na região hipocampal. A realização de pinealectomia causa uma abolição instantânea da NAS circulante, o que teoricamente poderia influenciar a plasticidade cerebral, gerando diferenças entre os grupos que tinham a produção de melatonina com relação aos pinealectomizados ou até mesmo àqueles que tinham a reposição hormonal realizada (uma vez que repor o hormônio melatonina não promove a reposição de NAS) entretanto isso não foi observado. Ao avaliar a expressão gênica circadiana desta neurotrofina, observou-se que não existe diferença significativa entre os pontos analisados dentro das 24 horas. Schaaf et al.

(2000) no primeiro trabalho que investigou a expressão gênica circadiana de Bdnf no hipocampo de ratos, notou diferença significativa em alguns pontos ao longo do dia somente na região do giro denteado destes animais, entretanto, ainda assim o mRNA desta proteína não apresentava ritmo circadiano. Regiões como CA1 e CA3 não apresentaram nenhuma variação ao longo de seis pontos dentro das 24 horas no mesmo trabalho. No nosso estudo, o mRNA (assim como a proteína) foi dosado em toda estrutura hipocampal, portanto, expressa a média do que acontece em cada uma das regiões.

Importante salientar que os receptores TrkB possuem ritmicidade circadiana nas regiões de CA3, giro denteado e hilo do hipocampo (DOLCI et al., 2003). Fato que poderia explicar o porquê da não variação do próprio Bdnf.

Com relação à expressão gênica do fator de crescimento derivado do endotélio (Vegf), não foi observada diferença relacionada à presença de melatonina bem como da realização do treinamento físico. A expressão gênica de Vegf varia consideravelmente de acordo com a duração do protocolo de atividade física, bem como do tempo esperado para a eutanásia do animal após a última sessão de treinamento (ELFVING et al., 2013). Uysal et al. (2014) mostraram um aumento nos níveis de Vegf em ratos adolescentes submetidos tanto ao treinamento forçado em esteira quanto à presença da roda de corrida voluntária na gaiola. Entretanto, pouquíssimos trabalhos se atentam a questão cronobiológica, e como observado na **figura 13**, a expressão gênica desta proteína possui uma flutuação ao longo do período de 24 horas, ainda, se encaixando na análise Cosinor, o que confere ritmicidade circadiana ao seu mRNA. Ainda, alguns estudos consideram o fato do treinamento físico possivelmente aumentar a síntese de melatonina nos animais (ATKINSON; DRUST; REILLY, 2003; KNIGHT; THOMPSON; RABOUD, 2005; RONKAINEN; VAKKURI; KAUPILLA, 1986) e esta diminui a expressão de Vegf em alguns tipos celulares (ALVAREZ-GARCÍA et al., 2012; LV et al., 2012; KAUR; VISWANATHAN; LING, 2011) o que poderia alterar os níveis do mRNA desta proteína em alguns tecidos.

Com relação à expressão gênica de Ki-67, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Tanto o treinamento físico quanto a ausência de melatonina não influenciaram os níveis de mRNA desta proteína, todavia, da mesma forma que a atividade física promove neurogênese com consequente aumento dos níveis proteicos de Dcx (FERREIRA et al., 2011; UDA et al., 2006) níveis elevados da proteína Ki-67 também são esperados. Sendo um marcador endógeno de proliferação celular, expresso nas fases G1, S e

G2 do ciclo celular (SCHOLZEN; GERDES, 2000) estima-se que tenhamos uma maior expressão deste no hipocampo dos animais que foram submetidos ao treinamento (CHORNA et al., 2013; ZHANG et al., 2013), contudo não obtivemos diferença em sua expressão gênica no ZT 18 entre os grupos. Faz-se necessário uma quantificação proteica. Com relação à ritmicidade circadiana do mRNA desta proteína, não foi observado diferença significativa nos oito pontos ao longo das 24 horas.

A expressão gênica de *Dcx*, também conhecido como doublecortina, mostrou-se mais acentuada nos grupos sedentários com relação aos grupos treinados. A melatonina novamente não pareceu influenciar os níveis da expressão gênica desta proteína, que está presente nos microtúbulos de neurônios jovens e é largamente utilizada na literatura para mensurar os níveis de neurogênese no cérebro de mamíferos (COUILLARD-DESPRES et al., 2005; UDA et al., 2006; VAN DER BORGHT et al., 2009). Sabidamente o exercício físico é um promotor da neurogênese hipocampal, acarretando, por consequência, uma maior expressão da proteína *Dcx* (FERREIRA et al., 2011, UDA et al., 2006). Entretanto, no nosso caso, isso não se refletiu na expressão do mRNA avaliado por PCR em Tempo Real, tampouco na quantificação proteica por Western blot. Contudo, ao avaliar a expressão gênica circadiana de *Dcx*, nota-se que o ponto onde existe a menor expressão deste mRNA é justamente no ZT 18, horário no qual os animais foram eutanasiados. Faz-se necessário realizar este mesmo experimento em diferentes ZTs do período circadiano, afim de que possamos encontrar o ponto exato onde existe maior presença destas proteínas estudadas no hipocampo dos animais, uma vez que tais dados não constam na literatura.

Na dosagem do corticosterona plasmática, hormônio relacionado a condições de estresse e que por vezes se mostra elevado durante treinamento físico, influenciando o processo de neurogênese hipocampal (CAMERON; GOULD, 1994) observamos níveis análogos entre os grupos controle (sedentário e treinado) o que confere ao protocolo de treinamento físico realizado a característica de agente não estressor. Contudo, também foi observado nos grupos pinealectomizados (sedentários e treinados), redução significativa nos níveis deste hormônio no ZT 18 (SCHAAF et al., 2000). Isso poderia se dever a ausência de melatonina, que estaria acarretando um adiantamento ou atraso de fase na secreção de corticosterona por estes animais, mesmo naqueles que tiveram a reposição de melatonina realizada na água de beber. Um estudo circadiano da secreção deste hormônio com os grupos controle e pinealectomizado se faz necessário na intenção de elucidar tal fato.

Observamos um paradoxo na literatura com relação ao tipo de exercício físico ideal para promoção da neurogênese hipocampal. O treinamento de baixa intensidade, parece ser o mais eficaz para observarmos alterações neuroplásticas (LOU et al., 2008), provavelmente em razão de uma menor liberação do hormônio corticosterona (CAMERON; GOULD, 1994), entretanto, diversos trabalhos que utilizam dos mais variados protocolos de treinamento (com relação a intensidade e volume) também observam (em diferentes magnitudes) neurogênese na estrutura hipocampal dos animais (FERREIRA et al., 2011; UDA et al., 2006; WU et al., 2008; ZHANG et al., 2013). Portanto, diferenças observadas nos parâmetros avaliados nestes estudos podem estar atreladas ao tipo de protocolo utilizado pelo pesquisador.

Vale enfatizar, que a maioria dos trabalhos presentes na literatura e aqui citados, não se atentam à questão da ritmicidade circadiana. Além das diferenças observadas em razão de diferentes protocolos de treinamento, questões como o momento em que este foi realizado bem como sua casualização, dia, hora e quanto tempo após a última sessão de treinamento foi realizada a eutanásia dos animais são fatores que devem ser considerados. Qualquer diferença em uma ou mais destas questões, pode influenciar a análise de interesse.

Uma observação importante deve ser feita. A técnica clássica pinealectomia usada nos experimentos acima, retira a pineal superficial deixando, ainda, a pineal profunda (**figura 1**). Esta, sabidamente, continua funcional e produzindo melatonina que não se reflete na circulação sistêmica mas que poderia estar sendo liberada no líquido céfalo-raquidiano. De fato, dados ainda não publicados do nosso laboratório indicam que a melatonina produzida pela pineal profunda está presente no sistema nervoso central (III ventrículo). Sendo assim, os animais pinealectomizados apesar de não apresentarem melatonina circulante apresentam melatonina no sistema nervoso central e isso pode estar influenciando os fenômenos estudados, explicando a diferença não existente até então entre os grupos pinealectomizados e controle. Para obviar esta questão pretende-se realizar num trabalho futuro mais quatro grupos experimentais de animais que sofram a remoção cirúrgica dos gânglios cervicais superiores, dividindo-os em grupos sedentários e treinados e repostos ou não com melatonina.

Justifica-se essa proposta porque dados existentes na literatura mostram que a ablação bilateral dos gânglios cervicais superiores inativa, completamente, a pineal profunda de ratos.

7 CONCLUSÃO

Nossas observações demonstram que apenas o treinamento físico acarretou mudanças na expressão gênica de fatores neurotróficos e de proteínas envolvidas nos processos plásticos cerebrais, além de não ter se mostrado um agente estressor em razão da não alteração nos níveis de corticosterona plasmática dos animais. A ausência de melatonina não alterou os níveis de mRNA de Bdnf, Vegf, Ki67 e Dcx no ZT 18. Somente o treinamento em esteira foi capaz de alterar a expressão gênica de Bdnf e de Dcx, fato que não se repetiu com a proteína deste último no mesmo *zeitgeber*. Ainda, mostramos o perfil circadiano da expressão gênica nas proteínas acima citadas, com oito pontos ao longo das 24 horas, dados que ainda não constam na literatura.

REFERÊNCIAS*

- ALOMARI, M. A.; KHABOUR, O. F.; ALZOUBI, K. H.; ALZUBI, M. A. Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. **Behav. Brain Res.**, v. 247, p. 34-39, 2013.
- ALVAREZ-GARCÍA, V.; GONZÁLEZ, A.; ALONSO-GONZÁLEZ, C.; MARTÍNEZ-CAMPA, C.; COS, S. Regulation of vascular endothelial growth factor by melatonin in human breast cancer cells. **J. Pineal Res.**, v. 54, p. 373-380, 2013.
- AMBROGINI, P.; LATTANZI, D.; CIUFOLLI, S.; BETTI, M.; FANELLI, M.; CUPPINI, R. Physical exercise and environment exploration affect synaptogenesis in adult-generated neurons in the rat dentate gyrus: Possible role of BDNF. **Brain Res.**, v. 1534, p. 1-12, 2013.
- ARENDT, J. **Melatonin and the mammalian pineal gland**. London: Chapman & Hall, 1995.
- ATKINSON, G.; DRUST, B.; REILLY, T. The relevance of melatonin to sports medicine and science. **Sports Med.**, v. 33, p. 809–831, 2003.
- BENITEZ-KING, G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. **J. Pineal Res.**, v. 40, p. 1–9, 2006.
- BERCHTOLD, N. C.; CHINN, G.; CHOU, M.; KESSLAK, J. P.; COTMAN, C. W. Exercise primers a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 133, p. 853–861, 2005.
- BLACKMORE, D. G.; GOLMOHAMMADI, M. G.; LARGE, B.; WATERS, M. J.; RIETZE, R.L. Exercise increases neural stem cell number in a growth hormone-dependent manner, augmenting the regenerative response in aged mice. **Stem Cells**, v. 27, p. 2044-2052, 2009.
- BORGES-SILVA C.; ALONSO-VALE, M. I.; FRANZÓI-DE-MORAES, S. M.; TAKADA, J.; PERES, S. B.; ANDREOTTI, S.; SKORUPA, A. L.; CIPOLLA-NETO, J.; PITHON-CURI, T. C.; LIMA, F. B. Pinealectomy impairs adipose tissue adaptability to exercise in rats. **J. Pineal Res.**, v. 38, p. 278-283, 2005.
- BORGES-SILVA, C.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I.; PERES, S. B.; FONSECA-ALANIZ, M. H.; ANDREOTTI, S.; CIPOLLA-NETTO, J.; PITHON-CURI, T. C.; LIMA, F. B. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. **J. Pineal Res.**, v. 43, p. 96-103, 2007.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Rio de Janeiro, 2002.

BRANDT, M. D.; MAASS, A.; KEMPERMANN, G.; STORCH, A. Physical exercise increases Notch activity, proliferation and cell cycle exit of type-3 progenitor cells in adult hippocampal neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 1256-1264, 2010.

BUXTON, O. M. L.; HERMITE-BALERIAUX, M.; HIRSCHFELD, U. Acute and delayed effects of exercise on human melatonin secretion. **J. Biol. Rhythms**, v. 12, p. 568–574, 1997.

CAMERON, H. A.; GOULD, E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 2, p. 203-209, 1994.

CARDINALI, D. P.; GOLOMBEK, D. A.; ROSENSTEIN, R. E.; CUTRERA, R. A.; ESQUIFIN, A.I. Melatonin site and mechanism of action: single or multiple? **J. Pineal Res.**, v. 263, p. 32-39, 1997.

CARLBERG, C.; WIESENBERG, I. The orphan receptor family RZR/_ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. **J. Pineal Res.**, v. 4, p. 171-178, Review, 1995.

CARPENTIERI, A.; DÍAZ DE BARBOSA, G.; ARECOA, V.; LÓPEZA, M.P.; TALAMONI, N. T. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, v. 65, p. 437–444, 2012.

CAO, L.; JIAO, X.; ZUZGA, D. S.; LIU, Y.; FONG, D. M.; YOUNG, D.; DURING, M. J. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. **Nat. Genet.**, v. 8, p. 827-835, 2004.

CHORNA, N. E.; SANTOS-SOTO, I. J.; CARBALLEIRA, N. M.; MORALES, J. L.; DE LA NUEZ, J.; CÁATALA-VALENTIN, A.; CHORNY, A. P.; VÁZQUEZ-MONTES, A.; DE ORTIZ, S. P. Fatty Acid Synthase as a Factor Required for Exercise-Induced Cognitive Enhancement and Dentate Gyrus Cellular Proliferation. **PLoS One**, v. 8, p. 77845, 2013.

CIPOLLA-NETO, J.; SKORUPA, A. L.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BARTOL, I.; MOTA, S. R.; AFECHÉ, S. C.; DELAGRANGE, P.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; CANTERAS, N. S. The role of the retrochiasmatic area in the control of pineal metabolism. **Neuroendocrinology**, v. 69, p. 97-104, 1999.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHÉ, S. C. Glândula pineal. In: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 981-990.

CLARK, P. J.; BRZEZINSKA, W. J.; PUCHALSKI, E. K.; KRONE, A. D.; RHODES, J. S. Functional analysis of neurovascular adaptations to exercise in the dentate gyrus of young adult mice associated with cognitive Gain. **Hippocampus**, v. 19, p. 937-950, 2009.

CONNOR, A. J. M.; PINDER, S. E.; ELSTON, C. W. Intratumoral heterogeneity of proliferation in invasive breast carcinoma evaluated with MIB-1 antibody. **Breast**, v. 6, p. 171–176, 1997.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Neuroscience**, v. 25, p. 295-301, 2002.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Physical activity and the maintenance of cognition: Learning from animal models. **Alzheimer's & Dementia**, v. 3, p. 30–37, 2007.

COUILLARD-DESPRES, S.; WINNER, B.; SCHAUBECK S.; AIGNER, R.; VROEMEN, M.; WEIDNER, N.; BOGDAHN, U.; WINKLER, J.; KUHN, H. G.; AIGNER, L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. **Eur. J. Neurosci.**, v. 21, p. 1-14, 2005.

CRUPI, R.; MAZZON, E.; MARINO, A.; LA SPADA, G.; BRAMANTI, P.; SPINA, E.; CUZZOCREA, S. Melatonin's stimulatory effect on adult hippocampal neurogenesis in mice persists after ovariectomy. **J. Pineal Res.**, v. 51, p. 353-360, 2011.

DE VRIES, C.; ESCOBEDO, J.A.; UENO, H.; HOUCK, K.; FERRARA, N.; WILLIAMS, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. **Science**, v. 5047, p. 989-991, 1992.

DOLCI, C.; MONTARULI, A.; ROVEDA, E.; BARAJON, I.; VIZZOTO, L.; GRASSI ZUCCONI, G.; CARANDENTE, F. Circadian variations in expression of the trkB receptor in adult rat hippocampus. **Brain Res.**, v. 994, p. 67-72, 2003.

EKSTROM, P.; MEISSL, H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 358, p. 1679-1700, 2003.

ELFVING, B.; CHRISTENSEN, T.; RATNER, C.; WIENECK, J.; KLEIN, A. B. Transient Activation of mTOR Following Forced Treadmill Exercise in Rats. **Synapse**, v. 67, p. 620–625, 2013.

EMSLEY, J. G.; MITCHELL, B. D.; KEMPERMANN, G.; MACKLIS, J. D. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. **Prog. Neurobiol.**, v. 75, p. 321–341, 2005.

FABEL, K.; FABEL, K.; TAM, B.; KAUFER, D.; BAIKER, A.; SIMMONS, N.; KUO, C. J.; PALMER, T. D. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. **Eur. J. Neurosci.**, v. 10, p. 2803-2812, 2003.

FABEL, K.; KEMPERMANN, G. Physical Activity and the Regulation of Neurogenesis in the Adult and Aging Brain. **Neuromol. Med.**, v. 10, p. 59- 66, 2008.

FERREIRA, A. F. B.; REAL, C. C.; RODRIGUES, A. C.; ALVES, A. S.; BRITTO, L. R. G. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, bdnf-independent hippocampal plasticity. **Brain Res.**, v. 1425, p. 111-122, 2011.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, v. 287, p. 1433–1438, 2000.

GOULD, E.; REEVES, A. J.; FALLAH, M.; TANAPAT, P.; GROSS, C. G.; FUCHS, E. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 5263–5267, 1999.

GRIFFIN, E. W.; BECHARA, R. G.; BIRCH, A. M.; KELLY, A. M. Exercise enhances hippocampal-dependent learning in the rat: evidence for a BDNF-related mechanism. **Hippocampus**, v. 19, p. 973-980, 2009.

HASHIMOTO, K. Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and future directions. **Psychiatry Clin. Neurosci.**, v. 4, p. 341-357, 2010.

HOFFMAN, R. A.; REITER, R. J. Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents. **Anat. Rec.**, v. 153, p. 19-21, 1965.

ITOH, T.; IMANO, M.; NISHIDA, S.; TSUBAKI, M.; HASHIMOTO, S.; ITO, A.; SATOU, T. Exercise increases neural stem cell proliferation surrounding the area of damage following rat traumatic brain injury. **J. Neural Transm.**, v. 118, p. 193-202, 2011.

JANG, S. W.; LIU, X.; PRADOLDEJ, S.; TOSINI, G.; CHANG, Q.; IU VONE, P. M.; YE, K. N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, p. 3876-3881, 2010.

JIN, K.; ZHU, Y.; SUN, Y.; MAO, X.O.; XIE, L.; GREENBERG, D. A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 18, p. 11946-11950, 2002.

JIN, J.; JING, H.; CHOIA, G.; OHB, M.S; RYUC, J.H.; JEONGA, J.W.; HUHA, Y.; PARKA, C. Voluntary exercise increases the new cell formation in the hippocampus of ovariectomized mice. **Neuroscience Letters**, v. 439, p. 260–263, 2008.

KAIPAINEM, A.; KORHONEN, J.; MUSTONEN, T.; VAN HINSBERG, V.W.; FANG, G.H.; DUMONT, D.; BREITMAN, M.; ALITALO, K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 92, p. 3566-3570, 1995.

KANNAGARA, T.S.; WEBBER A.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B.R. Stress Differentially Regulates the Effects of Voluntary Exercise on Cell Proliferation in the Dentate Gyrus of Mice. **Hippocampus**, v. 19, p. 889-897, 2009.

KAUR, C.; VISWANATHAN, S.; LING, E. A. Hypoxia-induced cellular and vascular changes in the nucleus tractus solitarius and ventrolateral medulla. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 70, p. 201-217, 2011.

KEMPERMANN, G. **Adult Neurogenesis**: stem cells and neuronal development in the adult brain. 2nd ed. USA: Oxford University Press, 2010.

KIM, H.; LEE, S. H.; KIM, S. S.; YOO, J. H.; KIM, C. J. The influence of maternal treadmill running during pregnancy on short-term memory and hippocampal cell survival in rat pups. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 25, p. 243–249, 2007.

KLEIN, D. C.; COON, S. L.; ROSEBOOM, P. H.; WELLER, J. L.; BERNARD, M.; GASTEL, J. A.; ZATZ, M.; IUVONE, P. M.; RODRIGUEZ, I. R.; BÉGAY, V.; FALCÓN, J.; CAHILL, G. M.; CASSONE, V. M.; BALER, R. The melatonin rhythm-generation enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. **Rec. Prog. in Horm. Res.**, v. 52, p. 307–358, 1997.

KNIGHT, J. A.; THOMPSON, S.; RABOUD, J. M. Light and exercise and melatonin production in women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 162, p. 1114–1122, 2005.

KILIC, E.; KILIC, U.; BACIGALUPPI, M.; GUO, Z.; ABDALLAH N.B.; WOLFER, D.P.; REITER, R. J.; HERMANN, D. K.; BASSETI, C. L. Delayed melatonin administration promotes neuronal survival, neurogenesis and motor recovery, and attenuates hyperactivity and anxiety after mild focal cerebral ischemia in mice. **J. Pineal Res.**, v. 45, p. 142–148, 2008.

KONG, X.; LI, X.; CAI, Z.; YANG, N.; LIU, Y.; SHU, J.; PAN, L.; ZUO, P. Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 28, p. 569–579, 2008.

LAFENÊTRE, P.; LESKE, O.; MA-HOGEMEIE, Z.; HAGHIKIA, A.; BICHLER, Z.; WAHLE P.; HEUMANN, R. Exercise can rescue recognition memory impairment in a model with reduced hippocampal neurogenesis. **Frontiers In Behavioral Neuroscience**, v. 3, p. 01–09, 2010.

LEE, H.; KIM, H.; LEE, J.; KIM, Y.; YANG, H.; CHANG, H.; LEE, T.; SHIN, M.; LEE, M.; SHIN, M.S.; PARK, S.; BAEK, S.; KIM, C. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. **Brain & Development**, v. 28, p. 147–154, 2006.

LINNARSSON, S.; BJÖRKLUND, A.; ERNFORS, P. Learning deficit in BDNF mutant mice. **Eur. J. Neurosci.**, v. 9, p. 2581–2587, 1997.

LISTA, I.; SORRENTINO, G. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 30, p. 493–503, 2010.

LOU, S. J.; LIU, J. Y.; CHANG, H.; CHEN, P. J. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Res.**, p. 48–55, 2008.

LOUISSAINT, A. Jr.; RAO, S.; LEVENTHAL, C.; GOLDMAN, S. A. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. **Neuron**, v. 6, p. 945–960, 2002.

LV, D.; CUI, P. L.; YAO, S. W.; XU, Y. Q.; YANG, Z. X. Melatonin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells. **Chin. J. Cancer Res.**, v. 24, p. 310-316, 2012.

MANDA, K.; UENO, M.; ANZAI, K. Cranial irradiation-induced inhibition of neurogenesis in hippocampal dentate gyrus of adult mice: attenuation by melatonin pretreatment. **J. Pineal Res.**, v. 46, p. 71–78, 2008.

MANDA, K.; REITER, R.J. Melatonin maintains adult hippocampal neurogenesis and cognitive functions after irradiation. **Progress in Neurobiology**, v. 90, p. 60-68, 2010.

MOLLER, M. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. **Microsc. Res. Tech.**, v. 3, p. 188-204, Review, 1992.

MORGAN, P.; BARRET, P.; HOWELL, H.; HELLIWEL, R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. **Neurochem. Int.**, v. 24, p. 101-146, 1994.

MORIYA, T.; HORIE, N.; MITOME, M.; SHINOHARA, K. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. **J. Pineal Res.**, v. 42, p. 411–418, 2007.

MUELLER, A. D.; MEAR, R. J.; MISTLBERGER, R. E. Inhibition of hippocampal neurogenesis by sleep deprivation is independent of circadian disruption and melatonin suppression. **Neuroscience**, v. 193, p. 170-181, 2011.

NEEPER, S. A.; GÓMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. W. Exercise and brain neurotrophins. **Nature**, v. 373, p. 109, 1995.

NEEPER, S. A.; GÓMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C. W. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res.**, v. 726, p. 49-56, 1996.

PALMER, T. D.; WILLHOITE, A. R.; GAGE, F. H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **J. Comp. Neurol.**, v. 4, p. 479-494, 2000.

PANG, P. T.; TENG, H. K.; ZAITSEV, E.; WOO, N. T.; SAKATA, K.; ZHEN, S.; TENG, K.K.; YUNG, W.H.; HEMPSTEAD, B.L.; LU, B. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. **Science**, v. 306, p. 487-491, 2004.

PARK, E.; CHAN, O.; Li, Q.; KIRALY, M.; MATTHEWS, S. G.; VRANIC, M.; RIDELL MC. Changes in basal hypothalamo-pituitary-adrenal activity during exercise training are centrally mediated. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 289, p. 1360-1371, 2005.

PICKERING, C.; GUSTAFSSON, L.; CEBERE, A.; NYLANDER, I.; LILJEQUIST, S. Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. **Brain Res.**, v. 1099, p. 101–108, 2006.

RAO, M. S.; SHETTY, A. K. Efficacy of doublecortin as marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newgenerated neurons in the adult dentate gyrus. **Eur. J. Neurosci.**, v. 19, p. 234-246, 2004.

REITER, R. J. Melatonin: the chemical expression of darkness. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 79, p. 153–158, 1991.

REITER, R. J. The melatonin rhythm - both a clock and a calendar. **Experientia**, v. 49, p. 654-664, 1993.

RENNIE, K.; BUTTE, M.; PAPAS, B. A. Melatonin promotes neurogenesis in dentate gyrus in the pinealectomized rat. **J. Pineal Res.**, v. 47, p. 313–317, 2009.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 17, p. 100-102, 1996.

RAMIREZ-RODRÍGUEZ, G.; KLEMPIN, F.; BABU, H.; KING, G. B.; KEMPERMANN, G. Melatonin modulates cell survival of new neurons in the hippocampus of adult mice. **Neuropsychopharmacology**. v. 34, p. 2180–2191, 2009.

RAMIREZ-RODRÍGUEZ, G.; LOPEZ, O.; ALONSO, A. D.; KING, G. A. B.; KEMPERMANN, G. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. **J. Pineal Res.**, v. 37, p. 50-59, 2011.

RONKAINEN, H.; VAKKURI, O.; KAUPPILA, A. Effects of physical exercise on the serum concentration of melatonin in female runners. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 65, p. 827–829, 1986.

SCHAAF, M. J.; DUURLAND, R.; DE KLOET, E. R.; VREUGDENHIL, E. Circadian variation in BDNF mRNA expression in the rat hippocampus. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 2, p. 342-344, 2000.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J. Cell Physiol.**, v. 182, p. 311-322, 2000.

SHARKEY, A. M.; DAY, K.; McPHERSON, A.; MALIK, S.; LICENCE, D.; SMITH, S. K.; CHARNOCK-JONES, D. S. Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 402-409, 2000.

SHIBUYA, M.; CLAESSEON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Exp. Cell Res.**, v. 312, p. 549-560, 2006.

SOMPOL, P.; LIU, X.; BABA, K.; PAUL, K. N.; TOSINI, G.; IUVONE, P. M.; YE, K. N-acetylserotonin promotes hippocampal neuroprogenitor cell proliferation in sleep-deprived mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 108, p. 8844-8849, 2011.

SOUMIER, A.; BANASR, M.; LORTET, S.; MASMEJEAN, F.; BERNARD, N.; KERKERIAN-LE-GOFF, L.; GABRIEL, C.; MILLAN, M. J.; MOCAER, E.; DASZUTA, A. Mechanisms contributing to the phase-dependent regulation of neurogenesis by the novel antidepressant, agomelatine, in the adult rat hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. 2390-2403, 2009.

SOTTHIBUNDHU, A.; PHANSUWAN-PUJITO, P.; GOVITRAPONG, P. Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. **J. Pineal Res.**, v. 49, p. 291-300, 2010.

TANG, K.; XIA, F. C.; WAGNER, P. D.; BREEN, E. C. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v. 170, p. 16-22, 2010.

TERMAN, B. I.; DOUGHER-VERMAZEN, M.; CARRION, M. E.; DIMITROV, D.; ARMELLINO, D. C.; GOSPODAROWICZ, D.; BOHLEN, P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 3, p. 1579-1586, 1992.

UDA, M.; ISHIDO, M.; KAMI, K.; MASUHARA, M. Effects of chronic treadmill running on neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus of adult rat. **Brain Res.**, v. 1104, p. 64-72, 2006.

UYSAL, N.; KIRAY, M.; SISMAN, A.; CAMSARI, U.; GENCOGLU, C.; BAYKARA, B.; CETINKAYA, C.; AKSU, I. Effects of voluntary and involuntary exercise on cognitive functions, and VEGF and BDNF levels in adolescent rats. **Biotech. Histochem.**, v. 9, p. 1-14, 2014.

VAN DER BORGHT, K.; KÓBOR-NYAKAS D. E.; KLAUKE, K.; EGGEN, B. J. L.; NYAKAS, C.; VAN DER ZEE, E. A.; MEERLO, P. Physical Exercise Leads to Rapid Adaptations in Hippocampal Vasculature: Temporal Dynamics and Relationship to Cell Proliferation and Neurogenesis. **Hippocampus**, v. 19, p. 928-936, 2009.

VAN PRAAG, H.; CHRISTIE, B. R.; SEJNOVSKI T. J. Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiation in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 96, p. 13427-13431, 1999.

VAN PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. **Neuromol. Med.**, v. 10, p. 128-140, 2008.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol. Rev.**, v. 3, p. 687-721, Review, 1998.

WIDENFALK, J.; OLSON, L.; THOREN, P. Deprived of habitual running, rats downregulate Bdnf and Trkb messages in the brain. **Neurosci. Res.**, v. 34, p. 125-132, 1999.

WU, C. W.; CHANG, Y. T.; YU, L.; CHEN, H.; JEN, C. J.; WU, S. Y.; LO, C. P.; KUO, Y. M. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. **J. Appl. Physiol.**, v. 105, p. 1585–1594, 2008.

ZHANG, L.; HU, X.; LUO, J.; LI, L.; CHEN, X.; HUANG, R.; PEI, Z. Physical exercise improves functional recovery through mitigation of autophagy, attenuation of apoptosis and enhancement of neurogenesis after MCAO in rats. **BMC Neurosci.**, v. 14, p. 46, 2013.