

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

JONATHAS RODRIGO DOS SANTOS

Uma semana de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) aumenta a plasticidade neuronal no hipocampo independentemente do estado redox

RIBEIRÃO PRETO

2020

JONATHAS RODRIGO DOS SANTOS

Uma semana de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) aumenta a plasticidade neuronal no hipocampo independentemente do estado redox

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica.
Orientadora: Dra. Luciane Carla Alberici

RIBEIRÃO PRETO

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

dos Santos, Jonathas Rodrigo

Uma semana de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) aumenta a plasticidade neuronal no hipocampo independentemente do estado redox. Ribeirão Preto, 2020.

55 p.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientadora: Dra. Luciane Carla Alberici

1. HIIT. 2. Plasticidade neuronal. 3. Estado redox.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus – “Ao único Deus, Salvador nosso, por Jesus Cristo, nosso Senhor, seja glória, e majestade, domínio e poder, antes de todos os séculos, agora e para todo o sempre. Amém.” (Judas 25).

Em segundo lugar gostaria de agradecer à minha família: minha mãe, pai, irmão e irmã por ter me ajudado durante essa longa e pesada jornada. À minha querida e doce namorada por ter me aconselhado e suportado nesses momentos tão difíceis.

Gostaria de agradecer com grande estima à minha orientadora, Luciane Carla Alberici que, apesar de toda a correria e preocupação, tem confiado em nosso trabalho.

Agradeço também ao doutor Anderson Vulczak pelo auxílio na redação do trabalho, especialmente nos momentos finais.

Aos colegas e parceiros de laboratório, deixo aqui o meu agradecimento. Peço desculpa por algum eventual esquecimento: Gustavo, Henrique, Simone, Ingrid, Carlos Couto, Carlos Dechandt, Anderson Souza, Ariele, Júlia e Higor. Alguns que não encontro há muito tempo, mas que me ajudaram e me ensinaram nessa trajetória: Bruno, Tanes, Igor, Michel, Lucas, Filipe, André e talvez alguns que no momento não consigo lembrar.

Agradeço também aos nossos queridos técnicos de primeira e última hora: Aninha, Alcides, Cris, Luciana Celibeli, Luciana Ângulo, Iêda e Célia.

Agradeço ao professor Leonardo da Silva Silveira que inicialmente abriu as portas do seu laboratório. Agradeço aos professores que me ajudaram e tem me ajudado no desenvolvimento desse trabalho: professora Elaine Del Bel e professora Aline Campos.

Gostaria de agradecer aos meus colaboradores de última hora, mas não menos importante, a doutora Glauce Crivellaro e Mariza Bortollanza.

Por fim, peço perdão por falhas e esquecimento de nomes importantes.

Muito obrigado.

“Por que dele, e por ele, e para ele são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.” (Romanos 11.36).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Dos Santos, Jonathas Rodrigo. **Uma semana de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) aumenta a plasticidade neuronal no hipocampo independentemente do estado redox.** 2020. 56 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

As evidências sugerem que o exercício físico afeta a plasticidade neuronal, bem como a saúde do cérebro. Esse efeito tem sido associado à capacidade do exercício em modular o estado redox celular, enquanto que o estresse oxidativo geralmente está associado ao dano neuronal. Embora o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) tenha sido uma tendência no campo do exercício físico, seu efeito na função cerebral ainda não está claro. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a plasticidade neuronal, o conteúdo mitocondrial e o estado redox após o treinamento HIIT de uma semana e cinco semanas. Camundongos machos com 13 semanas de idade (C57Bl/6) foram designados para grupos não treinados ou HIIT. O protocolo HIIT consistiu de três dias com repetições de pequenos intervalos a 120% da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), intercaladas com sessões de exercício contínuo de intensidade moderada, 30 min a 60% de $V_{m\acute{a}x}$. As análises por espectrometria de massa mostraram que uma semana de HIIT aumentou *minichromosome maintenance complex componente 2* (MCM2), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *doublecortin* (DCX), *voltage-dependent anion selective channel* (VDAC) e diminuiu *superoxide dismutase* (SOD2) no hipocampo. Além disso, uma semana de HIIT não promoveu alterações na produção de H_2O_2 e na concentração de proteínas carboniladas no hipocampo, bem como na produção de ânion superóxido no giro denteado. Cinco semanas de treinamento aumentou a atividade da citrato sintase no hipocampo e levou à uma diminuição na produção de ânion superóxido no giro denteado. HIIT atenuou a queda no conteúdo de células DCX-positivas no giro denteado ao longo do envelhecimento por cinco semanas. Concluindo, nosso protocolo HIIT aumentou a plasticidade neuronal e o conteúdo mitocondrial, independentemente das alterações no estado redox, adicionando novas ideias sobre a modulação neuronal induzido por novos modelos de treinamento.

Palavras-chave: HIIT, plasticidade neuronal e estado redox.

ABSTRACT

Dos Santos, Jonathas Rodrigo. **One week High-intensity interval training increases neuronal plasticity and mitochondrial biogenesis without changes in redox state.** 2020. 56 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Evidence suggests that physical exercise has effects on neuronal plasticity, as well as overall brain health. This effect has been linked to the exercise capacity in modulating the antioxidant status, while the oxidative stress is usually linked with the neuronal damage. Although, high-intensity interval training (HIIT) has been a training-trend in around world, its effect on brain function still is unclear. Thus, we aimed to assess the neuronal plasticity, mitochondrial and redox status after one and five-week HIIT training. Thirteen-week old male (C57Bl/6) mice were assigned to non-trained or HIIT groups. HIIT protocol consisted of three days with short bouts repetitions at 120% of maximum speed (V_{max}), intercalated with moderate-intensity continuous exercise sessions, 30 min at 60% V_{max} . The mass spectrometry analyses showed that one-week of HIIT increased *minichromosome maintenance complex componente 2* (MCM2), *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *doublecortin* (DCX), *voltage-dependent anion selective channel* (VDAC) and decreased *superoxide dismutase* (SOD2) in the hippocampus. In addition, one-week of HIIT promoted no changes in H_2O_2 production and carbonylated protein concentration in the hippocampus, as well as in superoxide anion production in the dentate gyrus. Five-week HIIT training increased hippocampus citrate sintase activity and decreased superoxide anion in dentate gyrus. HIIT attenuated the drop in the content of DCX-positive cells in the dentate gyrus throughout aging for five weeks. Concluding, our one-week HIIT protocol increased neuronal plasticity and mitochondrial biogenesis regardless of changes in redox status, adding new insights on the neuronal modulation induced by new models of training in low ROS conditions.

Key-word: HIIT, neuronal plasticity and redox state.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Ilustração do desenvolvimento de células granulares a partir de células tronco até o neurônio completamente maduro no giro denteado | 16 |
| Figura 2 - Desenho experimental | 24 |
| Figura 3 - Estrutura do programa de treinamento da semana 2 à semana 6 | 26 |
| Figura 4 - Efeito de uma semana de HIIT na plasticidade neuronal no hipocampo | 31 |
| Figura 5 - Efeito de uma semana de HIIT na formação de neurônios imaturos no giro denteado | 32 |
| Figura 6 - Efeito de uma semana de HIIT no conteúdo de Akt total e Akt fosforilada..... | 33 |
| Figura 7 - Efeito de uma semana de HIIT em parâmetros redox..... | 34 |
| Figura 8 - Efeito de cinco semanas de HIIT no estado redox do hipocampo, córtex e giro denteado | 35 |
| Figura 9 - Efeito de 5 semanas de HIIT na formação de células neuronais imaturas e no conteúdo de marcador de mitocôndria no hipocampo..... | 36 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Semana de adaptação ao treinamento..... | 24 |
| Tabela 2 - Protocolo de treinamento..... | 25 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1. Exercício físico e cérebro | 12 |
| 1.2. Plasticidade neuronal | 14 |
| 1.3. Plasticidade neuronal e exercício físico..... | 16 |
| 1.4. Plasticidade neuronal e estado redox..... | 19 |
| 1.5. Estado redox e regulação da plasticidade neuronal durante o exercício físico | 21 |
| 2. OBJETIVO..... | 22 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 3.1. Animais e desenho experimental..... | 23 |
| 3.2. Teste de carga incremental na esteira | 23 |
| 3.3. Programa de treinamento físico | 24 |
| 3.4. Análise da expressão de proteínas por Western Blotting | 26 |
| 3.5. Produção de peróxido de hidrogênio em hipocampo de camundongos | 27 |
| 3.6. Ensaio de proteína carbonilada..... | 27 |
| 3.7. Quantificação relativa de proteínas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)..... | 27 |
| 3.8. Ensaio de imuno-histoquímica e imagem..... | 28 |
| 3.9. Detecção de ânion superóxido no giro denteado | 29 |
| 3.10. Ensaio enzimático para determinação da atividade da citrato sintase | 30 |
| 3.11. Análise de dados | 30 |
| 4. RESULTADOS | 32 |
| 4.1. HIIT durante uma semana modula a plasticidade neuronal e o conteúdo mitocondrial no hipocampo | 32 |
| 4.2. HIIT durante uma semana não modula o estado redox no hipocampo | 34 |
| 4.3. HIIT durante cinco semanas reduziu a produção de ânion superóxido no giro denteado e reduziu o declínio em DCX | 35 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 38 |

| | |
|----------------------|----|
| 6. REFERÊNCIAS | 43 |
|----------------------|----|

1. INTRODUÇÃO

1.1. Exercício físico e cérebro

O número de doenças promovidas por fatores de risco como obesidade, fumo e sedentarismo crescem ano após ano. Alguns exemplos bem difundidos na literatura científica são as doenças cardiovasculares, câncer e doenças metabólicas como o diabetes mellitus tipo II. Entretanto, uma classe de doenças que merece atenção são as doenças neurodegenerativas. Dentre as mais relevantes podemos citar a doença de Parkinson, de Huntington e de Alzheimer (SELKOE, 2012).

Nesse sentido, a neurogênese hipocampal adulta, por ocorrer ao longo da vida, é postulada como uma importante contribuição para a reserva neurogênica com potencial na prevenção de doenças neurodegenerativas, especialmente nos momentos em que a doença se encontra silenciosa (KEMPERMANN, 2008; 2019; KEMPERMANN; GAGE; AIGNER; SONG *et al.*, 2018; SELKOE, 2012).

Evidências sustentam o crescimento exponencial dos efeitos positivos do exercício físico no cérebro em condições fisiológicas e patológicas, conforme o aumento observado de quase 800% nas últimas duas décadas (1999 à 2019) na quantidade de artigos do banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) com os termos de busca *physical exercise and brain*. Os trabalhos utilizam tanto modelo animal (especialmente camundongos e ratos) (E; BURNS; SWERDLOW, 2014; INOUE; HANAOKA; NISHIJIMA; OKAMOTO *et al.*, 2015) quanto modelo humano (HYODO; DAN; SUWABE; KYUTOKU *et al.*, 2012; SUWABE; BYUN; HYODO; REAGH *et al.*, 2018; SUWABE; HYODO; BYUN; OCHI *et al.*, 2017). Dentre as condições patológicas, é encontrado melhoras na memória de curta duração em modelos animais para a doença de Parkinson (CHO; SHIN; SONG; JUN *et al.*, 2013), na memória de curta duração e na memória espacial em modelos animais para a doença de Alzheimer (HOVEIDA; ALAEI; ORYAN; PARIVAR *et al.*, 2011; KIM; SHIN; KIM; BAEK *et al.*, 2014), na tendência agressiva e na aprendizagem de memória espacial em modelos animais para autismo (SEO; CHO; SHIN; KIM *et al.*, 2013) e habilidade de aprendizagem espacial em modelos animais de inflamação cerebral induzida por lipopolissacarídeos (KIM; KO; PARK; SHIN *et al.*, 2013). Em condições fisiológicas, o exercício físico é proposto como uma importante estratégia não farmacológica na busca da diminuição ou prevenção da progressão de doenças neurodegenerativas (KEMPERMANN, 2008; 2019; LLORENS-MARTIN, 2018). O exercício físico tem se mostrado como um dos

fatores protetores na prevenção do desenvolvimento de perdas cognitivas e demência (BERCHTOLD; KESSLAK; COTMAN, 2002; JEE; KO; SUNG; LEE *et al.*, 2008).

Ao analisar os regimes de treinamento (alta intensidade *vs.* moderada intensidade; contínuo *vs.* intervalado; duração) é encontrado uma grande quantidade de modelos na literatura (ERICKSON; LECKIE; WEINSTEIN, 2014; LOURENCO; FROZZA; DE FREITAS; ZHANG *et al.*, 2019; RADAK; KANEKO; TAHARA; NAKAMOTO *et al.*, 2001). Entretanto, grande parte dos trabalhos usam treinamento aeróbio em esteira (caracterizado por treinamento com maior duração, intensidade leve ou moderada e esforço contínuo) (ERICKSON; VOSS; PRAKASH; BASAK *et al.*, 2011; INOUE; HANAOKA; NISHIJIMA; OKAMOTO *et al.*, 2015; STEINER; MURPHY; MCCLELLAN; CARMICHAEL *et al.*, 2011).

Por outro lado, o regime de treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT, *high intensity interval training*) ainda não tem sido muito explorado no campo da neuroproteção. O HIIT é caracterizado por curtos períodos de esforço em alta intensidade (*e.g.* velocidade alta; 80 % à 100 % da capacidade máxima) separados por períodos de descanso.

O HIIT tem sido proposto como uma estratégia para maximizar o desempenho (*e.g.* força, capacidade aeróbia) e melhoras na saúde (BOYNE; DUNNING; CARL; GERSON *et al.*, 2013; GIBALA; LITTLE; MACDONALD; HAWLEY, 2012). Ao longo dos períodos de treinamentos (semanas ou meses) as sessões de treinamento semanais são intercaladas entre treinamento de alta intensidade e treinamento com intensidade leve/moderada com a finalidade de promover o maior ganho de desempenho (KENTTA; HASSMEN, 1998). Contudo, muitos trabalhos que utilizam treinamento de alta intensidade com finalidade neuroprotetiva são pouco caracterizados ou apresentam baixo controle de variáveis importantes do treinamento (*e.g.* relação carga de treinamento e descanso) (INOUE; HANAOKA; NISHIJIMA; OKAMOTO *et al.*, 2015; NOKIA; LENSU; AHTIAINEN; JOHANSSON *et al.*, 2016; OKAMOTO; YAMAMURA; LIU; MIN-CHUL *et al.*, 2015). Enquanto que alguns trabalhos com HIIT mostram resposta modesta na plasticidade neuronal (NOKIA; LENSU; AHTIAINEN; JOHANSSON *et al.*, 2016), outros não promoveram ganhos na capacidade de memória quando confrontado com exercício aeróbio/moderada intensidade (OKAMOTO; YAMAMURA; LIU; MIN-CHUL *et al.*, 2015).

1.2. Plasticidade neuronal

A plasticidade neuronal pode ser resumida em quatro níveis: molecular, celular, estrutural/funcional e comportamental. No nível molecular é compreendido as alterações em fatores neurotróficos como BDNF, IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*) e VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). No nível celular há a formação de novas células da glia (gliogênese), formação de novos neurônios (neurogênese), formação de novas sinapses entre os neurônios (sinaptogênese) e a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). O nível estrutural é caracterizado por modificações no volume de massa cinzenta, volume de massa branca, na atividade de receptores, na atividade neuronal e no fluxo sanguíneo cerebral. O nível comportamental é caracterizado por alterações na capacidade cognitiva e motora (EL-SAYES; HARASYM; TURCO; LOCKE *et al.*, 2019).

Abordagens secundárias que visam prevenir doenças neurodegenerativas se correlacionam com a capacidade do cérebro de formar novas estruturas ao longo da vida (KEMPERMANN, 2008; 2019), conforme apontado por evidências que demonstram a contínua adaptação do cérebro promovidas por experiências e atividades comportamentais (ROSENZWEIG; BENNETT, 1996). Uma das mais estudadas formas de plasticidade cerebral adulta envolve a formação de novos neurônios (neurogênese), principalmente no hipocampo, uma região fundamental nos processos de memória e aprendizagem (AIMONE; LI; LEE; CLEMENSON *et al.*, 2014). Apesar da formação de novos neurônios no hipocampo ao longo da vida de humanos ser questionada (BOLDRINI; FULMORE; TARTT; SIMEON *et al.*, 2018; SORRELLS; PAREDES; CEBRIAN-SILLA; SANDOVAL *et al.*, 2018), evidências indicam que é possível a geração de novos neurônios durante a vida humana (KEMPERMANN; GAGE; AIGNER; SONG *et al.*, 2018). Nesse sentido, a neurogênese durante a fase adulta pode contribuir na prevenção de falhas nas funções cognitivas relacionadas ao hipocampo, mas não na reposição da perda neuronal (KEMPERMANN, 2008; KEMPERMANN; GAST; KRONENBERG; YAMAGUCHI *et al.*, 2003).

A neurogênese adulta ocorre somente no hipocampo em humanos, em níveis muito baixos e somente um tipo de neurônio hipocampal é formado (*i.e.* neurônios granulares) (ERIKSSON; PERFILIEVA; BJORK-ERIKSSON; ALBORN *et al.*, 1998; ERNST; ALKASS; BERNARD; SALEHPOUR *et al.*, 2014; KEMPERMANN; GAGE; AIGNER; SONG *et al.*, 2018; SPALDING; BERGMANN; ALKASS; BERNARD *et al.*, 2013). Segundo Kempermann (2008), a formação de novos neurônios no hipocampo pode ser uma forma de aperfeiçoar as conexões neuronais dentro do próprio hipocampo (KEMPERMANN,

2008). Com um aumento da sensibilidade das redes de conexões do hipocampo, muitos pesquisadores tem proposto que a neurogênese hipocampal adulta melhora primariamente os processos de armazenamento de memória ao invés do processamento da memória (aprendizagem) (BECKER, 2005; DEISSEROTH; SINGLA; TODA; MONJE *et al.*, 2004; GOULD; TANAPAT; HASTINGS; SHORS, 1999; SNYDER; HONG; MCDONALD; WOJTOWICZ, 2005). E, em uma segunda linha de evidências, a neurogênese hipocampal pode estar envolvida fortemente nas emoções, especialmente no contexto da depressão (SAHAY; HEN, 2007; SANTARELLI; SAXE; GROSS; SURGET *et al.*, 2003).

A neurogênese hipocampal adulta é dividida em três etapas distintas: 1) a proliferação de células progenitoras neuronais (conhecidas como células não radiais do tipo 2); 2) diferenciação ou especificação do destino celular (formação de neurônios imaturos – células positivas para *doublecortin*, *NeuroD1*, *TBR1*- ou formação de astrócitos – células positivas para *GFAP*, *EAAT1*, *EAAT2*, *glutamina sintase*) e; 3) sobrevivência neuronal (formação de neurônios maduros – células positivas para *NeuN*, *MAP2*, sinaptofisina) (AIMONE; LI; LEE; CLEMENSON *et al.*, 2014; GAGE, 2000; KEMPERMANN; GAST; KRONENBERG; YAMAGUCHI *et al.*, 2003) (Figura 1). O BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*), assim como algumas proteínas *downstream* da sua via de sinalização (*e.g.* a cinase Akt), podem estar envolvidas nos mecanismos de maturação das novas células geradas, assim como os *input* excitatórios dos neurônios gabaérgicos (GE; GOH; SAILOR; KITABATAKE *et al.*, 2006; TOZUKA; FUKUDA; NAMBA; SEKI *et al.*, 2005).

No hipocampo, as células progenitoras neuronais migram da zona subgranular do giro dentado para a camada granular de células granulares do giro dentado, integrando dentro de um circuito já existente (GAGE, 2000). A formação de células do tipo 2 não radiais (células tronco proliferativas) aparentemente são formadas por divisão assimétrica das células do tipo 1 (células tronco radiais ou células tronco neurais), mas podem ocorrer também por divisão simétrica (BONAGUIDI; SONG; MING; SONG, 2012).(HODGE; KOWALCZYK; WOLF; ENCINAS *et al.*, 2008). As células do tipo 2 podem seguir um destino para a formação de novos neurônios ou podem formar células da glia, em especial, astrócitos (BONAGUIDI; WHEELER; SHAPIRO; STADEL *et al.*, 2011; BRUNNE; ZHAO; DEROUICHE; HERZ *et al.*, 2010).

Em humanos, a neurogênese adulta tem sido bem caracterizada somente no hipocampo (ERIKSSON; PERFILIEVA; BJORK-ERIKSSON; ALBORN *et al.*, 1998; SPALDING; BERGMANN; ALKASS; BERNARD *et al.*, 2013), enquanto que no bulbo olfatório ainda há controvérsias (BERGMANN; LIEBL; BERNARD; ALKASS *et al.*, 2012; CURTIS; KAM;

NANNMARK; ANDERSON *et al.*, 2007; SANAI; TRAMONTIN; QUINONES-HINOJOSA; BARBARO *et al.*, 2004). Alguns fatores externos que regulam a neurogênese são o estresse, a idade, o exercício e o enriquecimento ambiental (AIMONE; LI; LEE; CLEMENSON *et al.*, 2014).

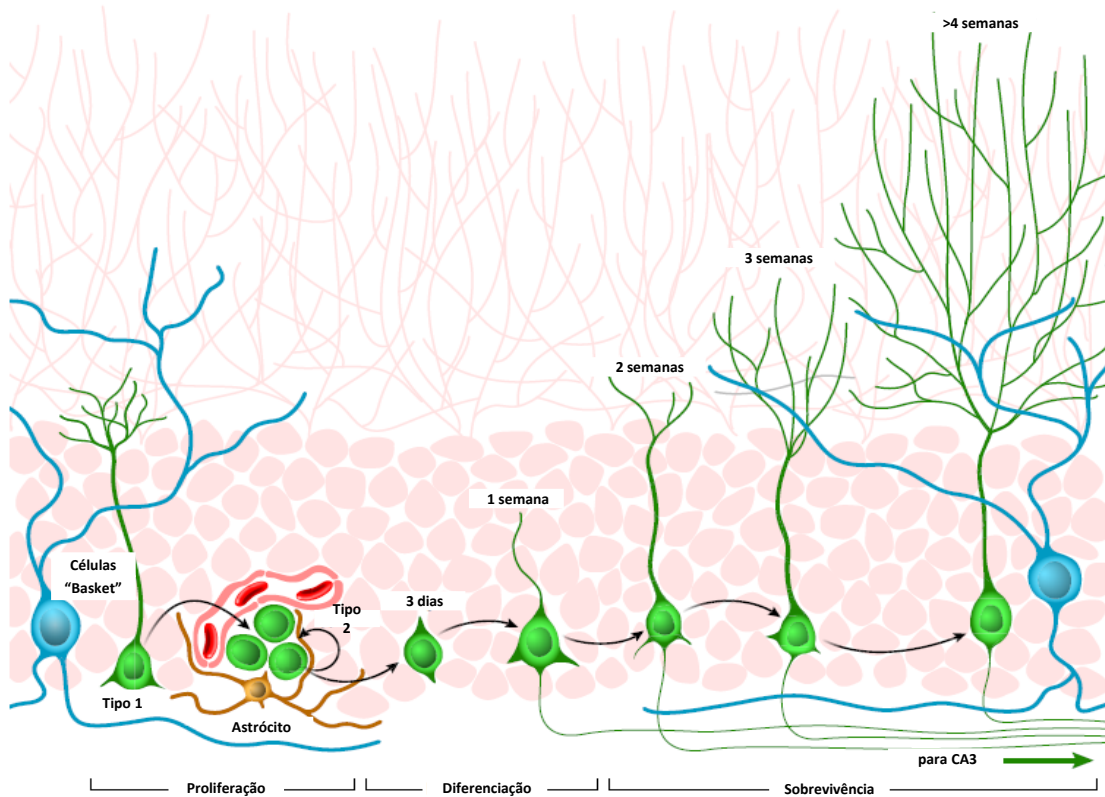


Figura 1: Ilustração do desenvolvimento de células granulares a partir de células tronco até o neurônio completamente maduro no giro denteado. Novos neurônios surgem de duas populações de células primitivas, células de divisão lenta do tipo 1, também conhecidas como células radiais da glia e células de amplificação mais rápida (células progenitoras do tipo 2). Ao longo das próximas semanas as células se diferenciam em neurônios, desenvolvendo lenta arborização dendrítica e projeções neuronais. Entre 2 e 3 semanas de idade, novos neurônios começam a receber *input* da via perforante cortical de axônios, e em 4-8 semanas, sua fisiologia e anatomia começa a se aproximar de neurônios totalmente maduros. Adaptado de Aimone e colaboradores (2014).

1.3. Plasticidade neuronal e exercício físico

O potencial efeito modulador do exercício físico no cérebro tem recebido cada vez mais atenção nas últimas décadas. O exercício físico induz a plasticidade neuronal em todos os níveis. O exercício físico, especialmente o exercício físico aeróbico crônico, é capaz de

aumentar as concentrações de fatores neurotróficos no cérebro (BDNF, IGF-1, VEGF) (CHENG; COXSAYGAN; TANG; KHATRI *et al.*, 2007; ZOLADZ; PILC; MAJERCZAK; GRANDYS *et al.*, 2008), promover a neurogênese e sinaptogênese (VAN PRAAG, 2008), aumentar o volume de massa cinzenta e branca (ERICKSON; LECKIE; WEINSTEIN, 2014), aumentar a atividade neuronal e de receptores neuronais (COLCOMBE; KRAMER; ERICKSON; SCALF *et al.*, 2004; RAICHLEN; BHARADWAJ; FITZHUGH; HAWS *et al.*, 2016), aumentar o fluxo sanguíneo cerebral (ZIMMERMAN; SUTTON; LOW; FLETCHER *et al.*, 2014) e melhorar a função cognitiva e motora (HUBNER; VOELCKER-REHAGE, 2017).

Em modelos animais da doença de Parkinson usando 6-hidroxidopamina há uma perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra acompanhado de perda de fibras dopaminérgicas no estriado, culminando em prejuízos na memória de curta duração. Porém, o exercício físico tem se mostrado capaz de reduzir a perda de células dopaminérgicas nigroestriatal e o prejuízo na memória de curta duração (CHO; SHIN; SONG; JUN *et al.*, 2013). Outra importante doença que tem se utilizado o exercício físico no provimento de valores terapêuticos é a doença de Alzheimer. Ainda, em modelo animal para doença de Alzheimer, utilizando a injeção intracerebroventricular de β -amilóide₂₅₋₃₅ (peptídeos com 25 à 35 aminoácidos) tem sido descrito que o exercício físico é capaz de aliviar o prejuízo na memória e aumentar o comprimento dendrítico apical no hipocampo (KIM; SHIN; KIM; BAEK *et al.*, 2014).

Tendo em vista os efeitos do exercício físico na plasticidade neuronal, pesquisas em humanos tem demonstrado que o exercício físico é capaz de melhorar a função de memória hipocampal. Uma única sessão de treinamento aeróbico leve é capaz de melhorar o padrão de separação relacionado à rede de atividade hipocampal em humanos e aumentar a conectividade entre as regiões do giro denteado/*cornu Ammonis* do hipocampo e regiões corticais (*i.e.* giro fusiforme, angular e parahipocampal) (SUWABE; BYUN; HYODO; REAGH *et al.*, 2018). Em modelos animais, os trabalhos com exercício físico demonstram uma melhora na capacidade de memória em animais velhos, na redução do estresse oxidativo no hipocampo e no aumento de fatores neurotróficos no hipocampo (VANZELLA; NEVES; VIZUETE; ARISTIMUNHA *et al.*, 2017).

A hipótese neurotrófica do mecanismo de ação do exercício físico implica em um aumento de neurotrofinas no sangue em resposta ao exercício (*e.g.* IGF-I, BDNF, VEGF), um mecanismo postulado para explicar a ação benéfica do exercício físico no cérebro e na função cognitiva (DU; WANG; YANG; WANG *et al.*, 2017; LLORENS-MARTIN, 2018).

Além da hipótese neurotrófica para a neurogênese, evidências tem mostrado que a sinalização desencadeada por meio da ativação de receptores de glicocorticóide também estão envolvidas no aumento da neurogênese hipocampal adulta durante o exercício físico moderado (OKAMOTO; YAMAMURA; LIU; MIN-CHUL *et al.*, 2015). Outra consideração importante nesse contexto são as condições do exercício que podem gerar diferentes respostas, como a relação de volume e intensidade de treinamento. Assim, condições de exercícios de intensidade leve e moderada resultam em um aumento na formação de novos neurônios, enquanto que programas de exercício extenuante pode mitigar a neurogênese hipocampal (OKAMOTO; YAMAMURA; LIU; MIN-CHUL *et al.*, 2015).

Apesar de estímulos físicos e cognitivos levarem ao aumento da neurogênese hipocampal, tem sido observado que os mecanismos por meio do qual esse processo ocorre são diferentes nas duas condições. Enquanto que o exercício físico/atividade física promove o aumento da divisão das células precursoras em diferenciação, o estímulo cognitivo por outro lado promove a sobrevivência das novas células após a mitose (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1997; KRONENBERG; REUTER; STEINER; BRANDT *et al.*, 2003). Contudo, ainda no trabalho de Kempermann (2008) é levantado a ideia de que essas distinções nos mecanismos de regulação da neurogênese podem ser ilusórios (KEMPERMANN, 2008). Essa questão é baseada nas evidências que mostram uma manutenção da proliferação de células precursoras em estímulos prolongados de exercício físico (CAHILL; COLE; YU; CLEMANS-GIBBON *et al.*, 2018; KRONENBERG; BICK-SANDER; BUNK; WOLF *et al.*, 2006).

De acordo com Kempermann e colaboradores (2008), o aumento de neurônios promovidos pelo exercício físico ao decorrer de longos períodos de tempo pode ser um sinal para o cérebro que há um aumento na probabilidade do ser vivo vivenciar situações com maior complexidade e novidade que são requeridas com especial atenção nos estágios finais da vida. Em outras palavras, o princípio estabelece que a neurogênese adulta é uma resposta à necessidade de locomoção como um indicador de desafio cognitivo. Ainda, segundo o trabalho de Kempermann (2008), a locomoção (*e.g.* exercício físico) é um estímulo não específico para a formação de novos neurônios que se correlaciona com eventos cognitivos específicos (*e.g.* atividades cognitivas). A ideia principal da reserva neurogênica é que os mecanismos de ação agem tanto em um espaço de tempo curto quanto em um longo espaço de tempo. Essa ideia pode ser observada na transmissão dos efeitos neurogênicos do exercício físico de mães para suas proles antes mesmo do nascimento (BICK-SANDER; STEINER; WOLF; BABU *et al.*, 2006). Em adição, animais idosos retém a capacidade de formar novos

neurônios no giro denteado, até mesmo em magnitudes maiores que em animais jovens (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1998).

Um dos mecanismos propostos que intermediam as adaptações benéficas do exercício na plasticidade neuronal é a modulação da dinâmica mitocondrial (LI; LIANG; DING; YAN *et al.*, 2019). O exercício físico intenso e moderado tem se mostrado eficaz na redução do acúmulo de β -amiloide na região CA1 do hipocampo, conjuntamente com o aumento da fragmentação mitocondrial e aumento da motilidade mitocondrial. Interessantemente, quando Li e colaboradores (2019) realizaram protocolos de treinamento de alta intensidade intervalado e protocolo de intensidade moderada, mas com equalização de cargas, ou seja, com a mesma soma da distância percorrida por sessão, encontraram adaptações muito semelhantes, desde os ganhos funcionais em testes de memória como o teste em labirinto de Morris e o teste de campo aberto até adaptações funcionais na mitocôndria (aumento da dinâmica mitocondrial) e na redução de β – amiloide₄₂ no giro denteado dos animais que fizeram exercício.

Enquanto a indústria farmacêutica tem falhado em propor uma terapia efetiva no desenvolvimento dessas doenças (LONG; HOLTZMAN, 2019), o exercício físico tem se mostrado, juntamente com atividade cognitiva, escolaridade e envolvimento social, como um fator do estilo de vida capaz de reduzir os riscos de demências em geral (INTLEKOFER; COTMAN, 2013; KEMPERMANN, 2019; LAUTENSCHLAGER; COX; FLICKER; FOSTER *et al.*, 2008). Embora evidências descrevam o exercício físico como um importante estímulo para a formação de novos neurônios no hipocampo na vida adulta, os mecanismos pelos quais esses processos ocorrem não foram esclarecidos. Mesmo reconhecendo a forte associação entre o aumento da neurogênese por enriquecimento ambiental ou pelo exercício físico com a melhora nas tarefas de aprendizagem, é necessário ressaltar que a neurogênese pode não ser responsável por todas as mudanças funcionais observadas nessas condições comportamentais (MESHI; DREW; SAXE; ANSORGE *et al.*, 2006).

1.4. Plasticidade neuronal e estado redox

As EROs são continuamente produzidas no metabolismo celular e, em altas concentrações podem aumentar o dano oxidativo e levar à neurodegeneração (RADAK; IHASZ; KOLTAI; GOTO *et al.*, 2014). A ideia da manutenção dos níveis de EROs no cérebro em condições normais é extremamente importante para a função do sistema nervoso. O papel das espécies reativas de O₂ (EROs) na sinalização molecular sobre condições

fisiológicas ainda é pouco entendido. Evidências recentes tem mostrado que as EROs podem participar no estabelecimento da polaridade neuronal, na orientação dos axônios, na regulação da conectividade neuronal, na regulação da transmissão sináptica e no ajuste das redes neuronais (OSWALD; GARNHAM; SWEENEY; LANDGRAF, 2018).

Evidências que suportam o papel da sinalização molecular por EROs no processo neurogênico são os perfis redox distintos em células progenitoras e células diferenciadas em neurônios (YAN; WLADYKA; FUJII; SOCKANATHAN, 2015). Células com alta capacidade de proliferação (*e.g.* células progenitoras; células do tipo 2) possuem altas concentrações de EROs. Quando células troncos neuronais e progenitoras neuronais isoladas da zona subventricular são expostas à inibidores de enzimas oxidantes como a NADPH oxidase, há uma perda na capacidade de proliferação dessas células (HOU; MATTSON; CHENG, 2013; LE BELLE; OROZCO; PAUCAR; SAXE *et al.*, 2011). Ainda, quando há um aumento na concentração de EROs em células tronco neuronais é visto um aumento no crescimento e proliferação dessas células (COLLINS; TUMPACH; GROVEMAN; DREW *et al.*, 2018). Por outro lado, o aumento na produção de EROs inibe a diferenciação neuronal (BECKERVORDER SANDFORTH, 2017; XAVIER; MORGADO; SOLA; RODRIGUES, 2014).

Além de ser uma importante via de sinalização na regulação da proliferação de células progenitoras neuronais, a via de sinalização Wnt/ β -catenina é sensível a modulação por estado redox (RHARASS; LANTOW; GBANKOTO; WEISS *et al.*, 2017). Trabalhos em cultura de neurônios demonstraram que o antioxidante N-acetilcisteína é capaz de aumentar a diferenciação neuronal e a formação de neuritos dose e tempo dependentes, mas sem efeitos na proliferação neuronal (QIAN; YANG, 2009). Além disso, pesquisas têm demonstrado que diferentes compartimentos celulares (*e.g.* retículo endoplasmático e citosol) possuem ambientes redox diferentes (YAN; WLADYKA; FUJII; SOCKANATHAN, 2015), tornando o entendimento do controle da diferenciação celular pelo estado redox desafiadora. A investigação de Yan e colaboradores (2015) demonstrou que a proteína peroxirredoxina 4 (Prdx4), uma enzima do retículo endoplasmático que metaboliza o H_2O_2 , atua harmoniosamente na regulação da neurogênese via compartimentalização da função oxidativa tiol. Ainda no trabalho de Yan e colaboradores (2015), foi demonstrado que a remoção de Prdx4 leva a diferenciação prematura de neurônios motores e à depleção de células precursoras neuronais. A dimerização de Prdx4 gerado através do metabolismo de H_2O_2 oxida dois resíduos de cisteína no domínio enzimático da GDE2 (uma proteína transmembrana de 6 domínios que induz a diferenciação através da regulação negativa da via de sinalização de

Notch por meio da clivagem na superfície de proteínas ancoradas à GPI), bloqueando o tráfego de GDE2 para a membrana plasmática e prevenindo a função neurogênica de GDE2.

1.5. Estado redox e regulação da plasticidade neuronal durante o exercício físico

O exercício físico tem sido apontado como um importante regulador da função neuronal e sua prática pode exercer um importante papel preventivo e terapêutico para o acidente vascular encefálico, a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (CHO; SHIN; SONG; JUN *et al.*, 2013; SELKOE, 2012). Os efeitos regulatórios do exercício podem envolver uma série de mecanismos, como a neurogênese via fatores neurotróficos, o aumento da capilarização, a diminuição do dano oxidativo e o aumento da degradação proteolítica por proteassoma e presinilina (RADAK; KUMAGAI; TAYLOR; NAITO *et al.*, 2007). Segundo Radak e colaboradores (2007), a modulação dos níveis de EROs induzidos pelo exercício físico exerce um papel no conteúdo de proteínas e na expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro (*BDNF*, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*), do receptor tirosina cinase B e de CREB (*cAMP response element binding protein*), resultando na melhora da função neuronal e no aumento da neurogênese.

Uma das respostas ao exercício físico regular é o aumento na regulação do sistema antioxidante enzimático e a modulação do dano oxidativo. O exercício físico regula o estado redox celular via modulação do metabolismo de forma dependente da intensidade e/ou por direta ativação de enzimas geradoras de EROs (RADAK; SUZUKI; HIGUCHI; BALOGH *et al.*, 2016).

Embora muitos estudos demonstrem os efeitos neuroprotetivos do exercício físico aeróbico (ERICKSON; VOSS; PRAKASH; BASAK *et al.*, 2011; HOVEIDA; ALAEI; ORYAN; PARIVAR *et al.*, 2011; VANZELLA; NEVES; VIZUETE; ARISTIMUNHA *et al.*, 2017), os efeitos do treinamento físico de alta intensidade (HIIT, do inglês *high intensity interval training*), caracterizado por curtos períodos de exercício aeróbico de alta intensidade com períodos de recuperação ainda são escassos (HURST; SCOTT; WESTON; WESTON, 2019). Nesse sentido, há investigações que utilizam o HIIT ao longo de 8 semanas falhando em demonstrar efeitos na plasticidade neuronal (NOKIA; LENSU; AHTIAINEN; JOHANSSON *et al.*, 2016), enquanto outros também utilizando o HIIT demonstraram aumento da neurogênese hipocampal (SO; HUANG; GE; CAI *et al.*, 2019), aumento na ação de BDNF (JIMENEZ-MALDONADO; RENTERIA; GARCIA-SUAREZ; MONCADA-JIMENEZ *et al.*, 2018) e aumento na capacidade antioxidante do cérebro (FREITAS;

ROCHA-VIEIRA; DE SOUSA; SOARES *et al.*, 2019; FREITAS; ROCHA-VIEIRA; SOARES; NONATO *et al.*, 2018).

Assim, visto que a modulação da plasticidade neuronal durante o exercício físico por EROs em condições controladas de intensidade e carga permanece um tema em aberto, o trabalho teve como hipótese que a regulação na plasticidade neuronal no hipocampo pelo HIIT ocorre de forma dependente do estado redox.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a plasticidade neuronal, o conteúdo mitocondrial e o estado redox em 1 e 5 semanas de treinamento intervalado de alta intensidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais e desenho experimental

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 (3 meses de idade) foram comprados do viveiro da Universidade de São Paulo (*Campus* Ribeirão Preto) e mantidos de 4 à 5 animais por caixa com livre acesso à comida e água em ciclo de claro/escuro de 12 horas à temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram divididos em sete grupos: controle (sedentários/basal), HIIT-1 (1 semana de treinamento) e controle-1 (sedentário), controle-3 (sedentário) e HIIT-3 (1 semana de treinamento), controle-5 (sedentário) e HIIT-5 (5 semanas de treinamento).

Antes de iniciar o protocolo de treinamento de alta intensidade, os animais do grupo treinado (HIIT) ficaram uma semana treinando em intensidade moderada (adaptação). No grupo basal, os animais foram sacrificados antes da semana de adaptação (sedentários). No grupo controle-1 e HIIT-1 os animais permaneceram sedentários por mais uma semana após a fase de adaptação e treinaram durante uma semana no protocolo de alta intensidade (HIIT), respectivamente. No grupo controle-3 e HIIT-3 os animais permaneceram sedentários por mais três semanas após a fase de adaptação e treinaram durante três semanas no protocolo de alta intensidade (HIIT), respectivamente. No grupo controle-5 e HIIT-5 os animais permaneceram sedentários por mais cinco semanas após a fase de adaptação e treinaram durante cinco semanas no protocolo de alta intensidade (HIIT), respectivamente (Figura 2). Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA nº 16.1.347.60.1).

3.2. Teste de carga incremental na esteira

O teste incremental na esteira foi realizado no mesmo período de treinamento dos animais (período escuro) na semana anterior ao início do programa de treinamento. Inicialmente os camundongos realizaram um aquecimento (15 min à 12 m/min). Após 1 minuto de repouso os animais iniciaram o teste incremental. No teste, os animais começam correndo na velocidade de 9 m/min e a cada 2 minutos é feito um incremento de 2 m/min na velocidade inicial. O desempenho máximo de cada animal foi considerado no momento em que os camundongos não conseguiram se manter na parte inferior da esteira por 10 segundos consecutivos. O teste foi realizado em 2 camundongos por vez e na inclinação da esteira foi de 20° (WISLOFF; HELGERUD; KEMI; ELLINGSEN, 2001).

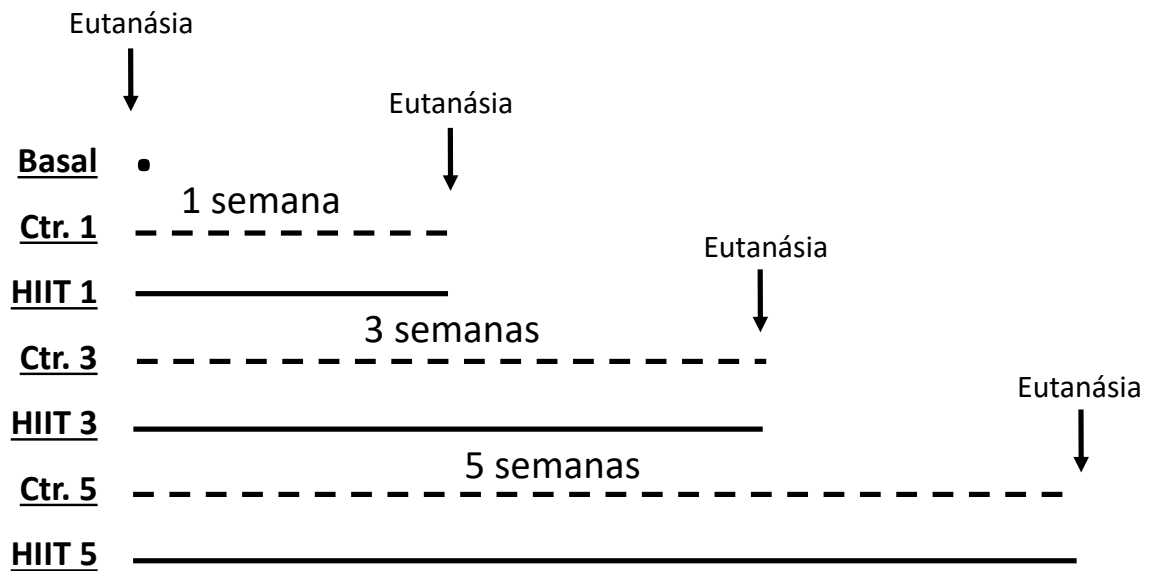


Figura 2 - Desenho experimental. Os camundongos foram divididos aleatoriamente em sete grupos. Um grupo foi sacrificado no início sem nenhuma intervenção (basal). Os grupos Ctr. (controle) e HIIT (exercício) foram divididos em um curso temporal separados por duas semanas entre cada tempo.

3.3. Programa de treinamento físico

O programa de treinamento físico foi realizado no período noturno dos camundongos e com a esteira na inclinação de 20°, assim como o teste incremental de carga incremental. Os animais começaram a correr com 13 semanas de vida. Na quarta semana de treinamento foi realizado um segundo teste incremental de carga na esteira para ajustar a intensidade do programa de treinamento. O protocolo de treinamento teve a duração de 1, 3 e 5 semanas, sendo a primeira semana somente seções de treinamento contínuo à 60% da máxima velocidade encontrada no teste de carga incremental com duração de 15 à 45 minutos (Semana de adaptação; Tabela 1).

Tabela 1 – Semana de adaptação ao treinamento.

| | Sessão 1 | Sessão 2 | Sessão 3 | Sessão 4 | Sessão 5 |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Duração | 15 min | 30 min | 15 min | 45 min | 30 min |
| Intensidade | | | | | |
| (% da vel. Máxima) | 60 % | 60 % | 60 % | 60 % | 60 % |

Os camundongos iniciaram o protocolo de treinamento de alta intensidade (HIIT) na segunda semana. Todas as sessões de treinamento começaram com 15 minutos de aquecimento à 50 % da velocidade máxima do teste incremental de carga e finalizaram uma fase de volta à calma de 5 minutos à 40 % da velocidade máxima do teste incremental de carga. A partir da segunda semana as sessões de alta intensidade foram realizadas de forma alternada (sessão 1: segunda-feira; sessão 3: quarta-feira; sessão 5: sexta-feira). A sessão 2 e 4 foram sessões de treinamento com intensidade moderada (terça e quinta-feira, respectivamente) com velocidade à 60% da velocidade máxima do teste incremental de carga e 30 minutos de duração. (Tabela 2).

Tabela 2 – Protocolo de treinamento

| | Sessão 1 | Sessão 3 | Sessão 5 |
|--------------------------------|---------------|--------------|-------------|
| | Segunda-Feira | Quarta-feira | Sexta-Feira |
| Duração | 30 segundos | 30 segundos | 30 segundos |
| Repetições | 4 vezes | 4 vezes | 4 vezes |
| Intensidade (% da Vel. Máxima) | 120 % | 120 % | 120 % |
| Intervalo | 2 minutos | 2 minutos | 2 minutos |

Nas próximas semanas foi realizado um ajuste na quantidade de esforços das sessões da sessão 1, 3 e 5. A cada semana foi aumentado 2 repetições de esforços, finalizando a sexta semana com 12 repetições de esforços. O protocolo de treinamento de alta intensidade (HIIT; *high intensity interval training*) foi dividido semanalmente da seguinte forma: sessão 1, 3 e 5: 120% da máxima velocidade encontrada no teste incremental de carga; sessão 2 e 4: 60% da máxima velocidade encontrada no teste incremental de carga (Figura 3).

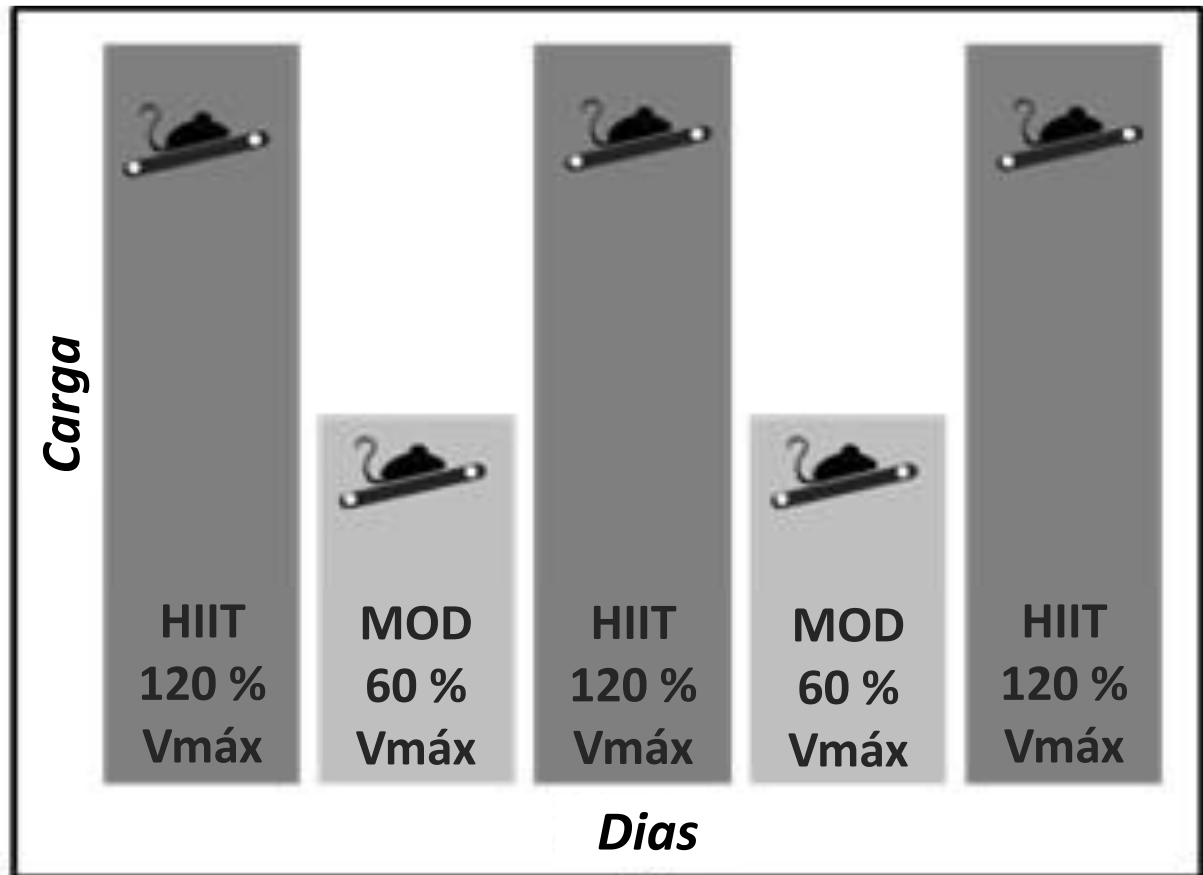


Figura 3. Estrutura do programa de treinamento da semana 1 à semana 5. Após a primeira semana de adaptação em intensidade moderada, os animais iniciaram o programa de treinamento de alta intensidade intervalado. A intensidade do HIIT foi por volta de 120 % da máxima velocidade encontrada no teste incremental de carga e de 60 % nos dias de recuperação (terça e quinta-feira).

3.4. Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

O hipocampo foi homogeneizado em 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4) contendo inibidor de protease e fosfatase. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) e então misturada com tampão de amostras para gel de SDS-PAGE. Quantidades iguais de proteínas foram adicionadas no gel e posteriormente separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de difloreto de polivinilideno. As proteínas foram detectadas utilizando anticorpo para *phospho-Akt* (Ser 437) e BDNF. Akt foi comprado da *Cell Signaling Technology (Boston, MA)* e BDNF da *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* Os resultados foram normalizados usando β -actina (*Cell Signaling Technology*) e apresentados como unidades arbitrárias (U.A.). Procedimentos similares foram utilizados em estudos

anteriores (HIRABARA; FOLADOR; FIAMONCINI; LAMBERTUCCI *et al.*, 2013; MARZUCA-NASSR; VITZEL; DE SOUSA; MURATA *et al.*, 2016).

3.5. Produção de peróxido de hidrogênio em hipocampo de camundongos

O monitoramento de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por espectrofluorometria usando 2 µM da sonda Amplex Red na presença da enzima *horseradish peroxidase* (1 U/mL) (ZHOU; DIWU; PANCHUK-VOLOSHINA; HAUGLAND, 1997) com temperatura constante de 37°C. Os comprimentos de onda utilizados para a excitação/emissão foram respectivamente 563/587 nm. Foi utilizado o espectrofotômetro de fluorescência de placas *Model Synergy 2 Biotek* com agitação contínua. Na normalização foi calculado a variação de fluorescência (delta da fluorescência) pela variação de fluorescência no tempo dividido pelo conteúdo de proteína.

3.6. Ensaio de proteína carbonilada

O conteúdo de proteína carbonilada em tecido foi determinado pelo método de Colombo e colaboradores (COLOMBO; CLERICI; GARAVAGLIA; GIUSTARINI *et al.*, 2016). O hipocampo foi homogeneizado em tampão 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4). Em seguida, o homogenato do hipocampo foi posteriormente incubado na presença de 10 mM DNPH (2,4 dinitrofenilhidrazina; diluído em 2,0 M HCl) por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida a solução foi misturada com ácido tricloroacético (TCA; concentração final de 10 %), mantidas no gelo por 15 minutos e centrifugadas (5000 x g; 4° C; 5 minutos). O *pellet* foi lavado 1 vez com 20 % TCA e três vezes com etanol:acetato de etila (1:1). Após as lavagens o *pellet* foi ressuspendido em 6 M guanidina e incubado por 30 minutos em agitação à 37° C. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 366 nm. O conteúdo de proteína carbonilada foi expresso em nmol de carbonis/mg de proteína usando o coeficiente de absorção molar do DNPH (22000 M⁻¹cm⁻¹). No final foi realizado a mensuração da concentração de proteínas pelo método do ácido bicinconínico ((SMITH; KROHN; HERMANSON; MALLIA *et al.*, 1985).

3.7. Quantificação relativa de proteínas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS)

As amostras (100 µg de proteínas) para a quantificação relativa de proteínas por LC-MS/MS de biópsias de hipocampo (homogeneizados em tampão RPPA) foram inicialmente desnaturadas em solução 1:1 de 8 M uréia e tampão 100 mM Tris-HCl (pH 8,5) em mesmo volume de amostra. Após a agitação foi adicionado 33 µL de ditionotretiol (0,1 M) e incubado por 30 minutos a 37° C com agitação (800 rpm). Em seguida foi adicionado 7 µL de iodoacetoamida (0,5 M) e incubado por 30 minutos à 25° C com agitação (800 rpm) na ausência de luz. A fim de reduzir a alcalinidade, foram adicionados 740 µL de Tris (100 mM) e, em seguida adicionado 40 µL de tripsina (0,1 µg/µL em ácido fórmico 50 mM) e incubado a 37° C por 16 horas em agitação (800 rpm). Após a incubação a digestão foi interrompida com a adição de 45 µL de ácido acético (20%).

Para retirar as impurezas as amostras passaram por um processo de purificação com uma coluna de fase reversa (OASIS®, # 186000383). Primeiro a coluna foi condicionada com a adição de 500 µL de acetonitrila, posteriormente foi adicionado 1 mL de acetonitrila 50% (duas adições de 500 µL), adicionado as amostras e novamente 500 µL de acetonitrila 50 %. Por fim as amostras foram eluídas com 600 µL de acetonitrila 70 % (3 adições de 200 µL). O material eluído foi colocado em um microtubo e posteriormente seco e ressuscitado com 50 µL da mistura de acetonitrila (5%) e ácido fórmico (0,1 %) (FACA; CORAM; PHANSTIEL; GLUKHOVA *et al.*, 2006).

Cada amostra foi injetada em triplicata através do sistema LC – MS/MS Xevo TQSS (Waters). A separação cromatográfica foi realizada através da cromatografia líquida de alta performance (I-classe, Waters) usando coluna C18 (1,8 µm de tamanho de partícula, 100 Å de poro, 1 mm x 150 mm, Waters) em gradiente linear de 5 à 30 % de acetonitrila (em água e 0,1 % de ácido fórmico) ao longo de 30 minutos à 100 µL/min. A detecção de peptídeos foi realizada através de 3-5 fragmentos de peptídeos durante uma janela de 2 minutos. A análise foi realizada utilizando o programa Skyline 3.5 (MACLEAN; TOMAZELA; SHULMAN; CHAMBERS *et al.*, 2010). A lista de proteínas, peptídeos, fragmentos e suas respectivas características estão no anexo 1.

3.8. Ensaio de imuno-histoquímica e imagem

Após cada tempo (2, 4 e 6 semanas após a linha de base) os camundongos foram anestesiados com 10% cetamina (80 mg/Kg) e 4 % xilazina (10 mg/mL) e perfundidos com 4% paraformaldeído (diluído em tampão Somogy-Takagy). Os cérebros foram removidos e mantidos em solução de 8% paraformaldeído (diluído tampão Somogy-Takagy) 4 horas. Em

seguida os cérebros foram transferidos para uma solução de 30% sacarose e mantidos por 48 horas. Posteriormente os cérebros foram cortados em secções com espessura de 30 µm em um criostato (Cryocut, 1800, Leica, Heerbrugg-Switzerland) para obter fatias contendo o hipocampo (1 em 6 séries de secções do hipocampo localizados entre 0,94 e 2,7 mm posterior à bregma) foram normalizados pela área do giro denteado utilizando objetiva de 10x (FRANKLIN; PAXINOS, 1997). As secções foram incubadas em tampão 10 mM citrato (60° C, 30 minutos) e lavados posteriormente com PBS + 0,15% triton x100. Entre todas as etapas foram realizadas 3 lavagens com PBS + 0,15% triton x100. A peroxidase endógena foi inibida em seguida com incubação em 1% H₂O₂ por 30 minutos. Em seguida, as secções foram incubadas com uma solução contendo 2% albumina de soro bovino e 5% de soro de cabra por 60 minutos para bloqueio de reações inespecíficas. Após o bloqueio as secções foram incubadas *overnight* com o anticorpo primário (goat anti-doublecortin 1:6000; *Santa Cruz Biotechnology*). Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário por 90 minutos (goat-anti-rabbit; 1:1000). Posteriormente foi incubado com complexo avidina/biotina conjugado à peroxidase por 2 horas (Vectastain ABC kit, Vector Lab, Burlingame, CA, U.S.A.). A imunoreatividade foi revelada adicionando o diaminobenzidina (Sigma).

As células positivas para DCX foram analisadas em microscopia de campo claro (Leica, 40x), onde foram contadas células presentes na zona subgranular do giro denteado e na camada de células granulares de 3 secções de cada animal. O volume da camada de células granulares foi calculado através da multiplicação da espessura das secções (30 µm) pela área em 2 dimensões (medidas das imagens utilizando o *software ImageJ* – NIH). No final foi calculado a densidade de células positivas para DCX em cada secção do hipocampo.

3.9. Detecção de ânion superóxido no giro denteado

Após cada tempo (2, 4 e 6 semanas após a linha de base) os camundongos foram anestesiados com 10% cetamina (80 mg/Kg) e 4 % xilazina (10 mg/mL). Em seguida os animais foram sacrificados e os cérebros foram congelados em tissue tek. Posteriormente os cérebros foram cortados em secções com espessura de 16 µm em um criostato (Cryocut, 1800, Leica, Heerbrugg-Switzerland) para obter fatias contendo o hipocampo (1 em 6 séries de secções do hipocampo localizados entre 0,94 e 2,7 mm posterior à bregma) (FRANKLIN; PAXINOS, 1997).

Uma técnica histoquímica utilizando sonda fluorescente foi aplicada para a detecção de ânion superóxido no giro denteado. As secções com 16 µm de espessura das mesmas regiões do cérebro utilizadas na imunohistoquímica (contendo o hipocampo) foram incubadas com diidroetídeo (DHE – 10 Mm) por 15 min escondido da luz e em câmara úmida. Então, as secções foram lavadas com solução salina e fixadas em 4% paraformoldeído. A reação de DHE com o ânion superóxido presente nos tecidos produz 2-hidroxi-etídeo (excitação = 500-530 nm; emissão = 590-620). Foi utilizado um microscópio de fluorescência para a captura das imagens com objetiva de 40 x (*Leica Imaging System Ltd., Cambridge, UK*). Para a quantificação da intensidade de fluorescência emitida foi utilizado o software ImageJ (*National Institute of Health*).

3.10. Ensaio enzimático para determinação da atividade da citrato sintase

Em banho de gelo, os tecidos foram homogeneizados em um tampão contendo 250 µg/mL de sacarose, 1 µg/mL de EGTA e 10 µg/mL de HEPES-KOH (pH 7,2), proporcionalmente a massa, ou seja, a cada 50 mg de tecido era 1 ml de tampão. O homogenato resultante foi centrifugado a 12000 G por 10 minutos a 4° C, sendo o sobrenadante coletado e utilizado na quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Em uma placa de 96 poços, a cinética da citrato sintase foi determinada usando 50 µg de proteína e detectada em comprimento de onda de 412 nm por 2 minutos com intervalos de 10 segundos em temperatura ambiente. O meio reacional foi composto por 0,1 µg/mL de acetil-CoA, 0,1 µg/mL de DTNB, 0,1 % de Triton X-100, 0,2 µg/mL de oxaloacetato, 0,1 M de tampão Tris, pH 8,0 (KUZNETSOV; LASSNIG; GNAIGER, 2010).

3.11. Análise de dados

A análise estatística foi realizada utilizando o software *GraphPad Prism*TM5.0. As variáveis foram comparadas utilizando ANOVA com duas vias e o teste *post hoc* de Bonferroni para análises com dois fatores e o teste t de *Student* não pareado com dois grupos. Foi considerado significativo quando o $p < 0,5$. Para a análise do resultado de LC-MS/MS, foi calculado a média da área abaixo do pico das proteínas do grupo HIIT-1 que foram maiores que a média das proteínas do grupo controle-1. Em seguida foi realizado uma linha de corte das proteínas com valores acima e abaixo da média de proteínas que tiveram valores maiores

que o controle-1. De forma similar, foi realizado o cálculo das proteínas do grupo HIIT que tiveram valores menores que o grupo controle-1.

4. RESULTADOS

4.1. HIIT durante uma semana modula a plasticidade neuronal e o conteúdo mitocondrial no hipocampo

O protocolo de treinamento de alta intensidade durante uma semana foi capaz de aumentar o conteúdo de proteínas relacionadas à plasticidade neuronal no hipocampo. A análise de espectrometria de massas mostrou um aumento na expressão de proteínas utilizadas como biomarcadores para proliferação celular (MCM2) (HANNA-MORRIS; BADVIE; COHEN; MCCULLOUGH *et al.*, 2009), conteúdo de células imaturas (DCX) (AYANLAJA; XIONG; GAO; JI *et al.*, 2017) e conteúdo mitocondrial (VDAC) (ZILOCCHI; FINZI; LUALDI; SESSA *et al.*, 2018) no grupo HIIT-1 em comparação com o grupo controle-1. Não foi observado mudanças no conteúdo de Ki67, Nestin, HuR, Glast, Syn1, NeuN, MAP2 e TOM20. Ademais, a enzima antioxidante mitocondrial superóxido dismutase 2, responsável pela dismutação do radical O_2^- em H_2O_2 ((FRIDOVICH, 1997) foi reduzida no hipocampo de animais que treinaram por uma semana (Figura 4).

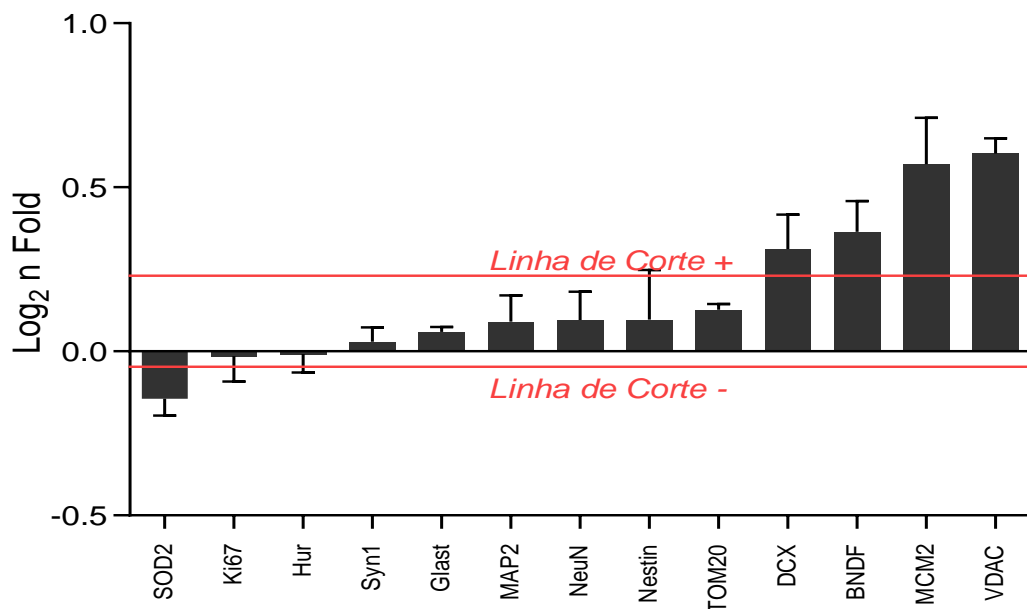


Figura 4 – Efeito de uma semana de HIIT na plasticidade neuronal no hipocampo. Proteínas relacionadas com a proliferação e crescimento de células tronco: Ki67, MCM2, Nestin, HuR, Glast. Proteína relacionada com neurônios imaturos: DCX. Proteína relacionada com neurônios maduros: NeuN. Proteína relacionada com a neuritogênese: MAP2. Proteína relacionada com a sobrevivência neuronal: BDNF. Proteína relacionada com a sinaptogênese: Syn1. Marcador de conteúdo

mitocondrial: TOM20, VDAC. Enzima antioxidante mitocondrial: SOD2. Valores obtidos como pico da área do íon/pico da área da α -tubulina. Linha de corte +: média das proteínas que aumentaram em relação ao controle. Linha de corte -: média das proteínas que diminuíram em relação ao controle. Controle: n = 3; Exercício: n = 3.

Adicionalmente, após uma semana de HIIT foi observado uma mudança na proliferação celular e diferenciação comparado com o controle. Nesse sentido, a razão Akt fosforilada por Akt total, um indicativo da ativação da via da Akt (WANG; YANG; ZHANG; SMITH *et al.*, 2019) foi maior no hipocampo de animais que treinaram (Figura 5A e 5B) e as análises de imuno-histoquímica mostraram uma tendência de aumento no conteúdo de DCX no giro denteado do grupo HIIT-1 em comparação com o grupo controle-1 (Figura 6A e 6B).

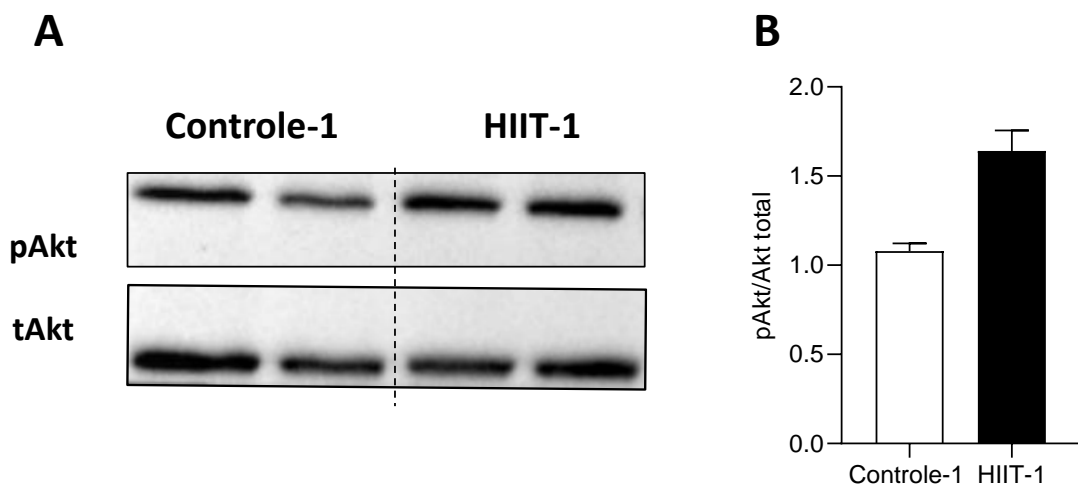


Figura 5 – Efeito de uma semana de HIIT no conteúdo de Akt total e Akt fosforilada.

(A) Imunoblotting e (B) densitometria do imunoblotting da razão pAkt/Akt total. (Controle, n = 2; HIIT, n = 2).

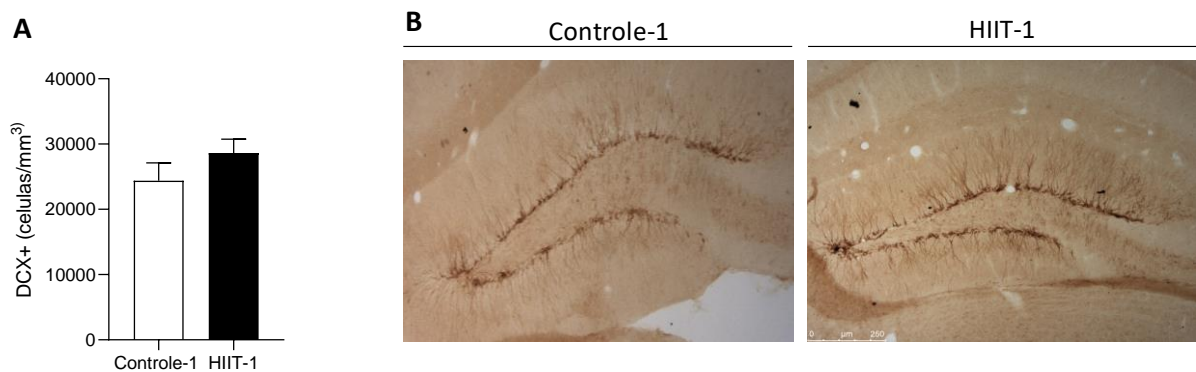


Figura 6 – Efeito de uma semana de HIIT na formação de neurônios imaturos no giro denteado. (A) Quantificação e (B) imuno-histoquímica de DCX no giro denteado (controle-1: n = 6; HIIT-1: n = 7). A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* de *Student*, $p < 0,05$.

4.2. HIIT durante uma semana não modula o estado redox no hipocampo

A promoção da plasticidade neuronal após uma semana de treinamento intervalado de alta intensidade ocorreu independentemente do estado pró-oxidante. As análises não mostraram alterações na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no hipocampo (Figura 7A) e córtex (Figura 7B), ou ânion superóxido (SO) no giro denteado (Figura 7C) entre animais sedentários e treinados, nem alterações no marcador do estado oxidado (conteúdo de proteína carbonilada) (Figura 7D).

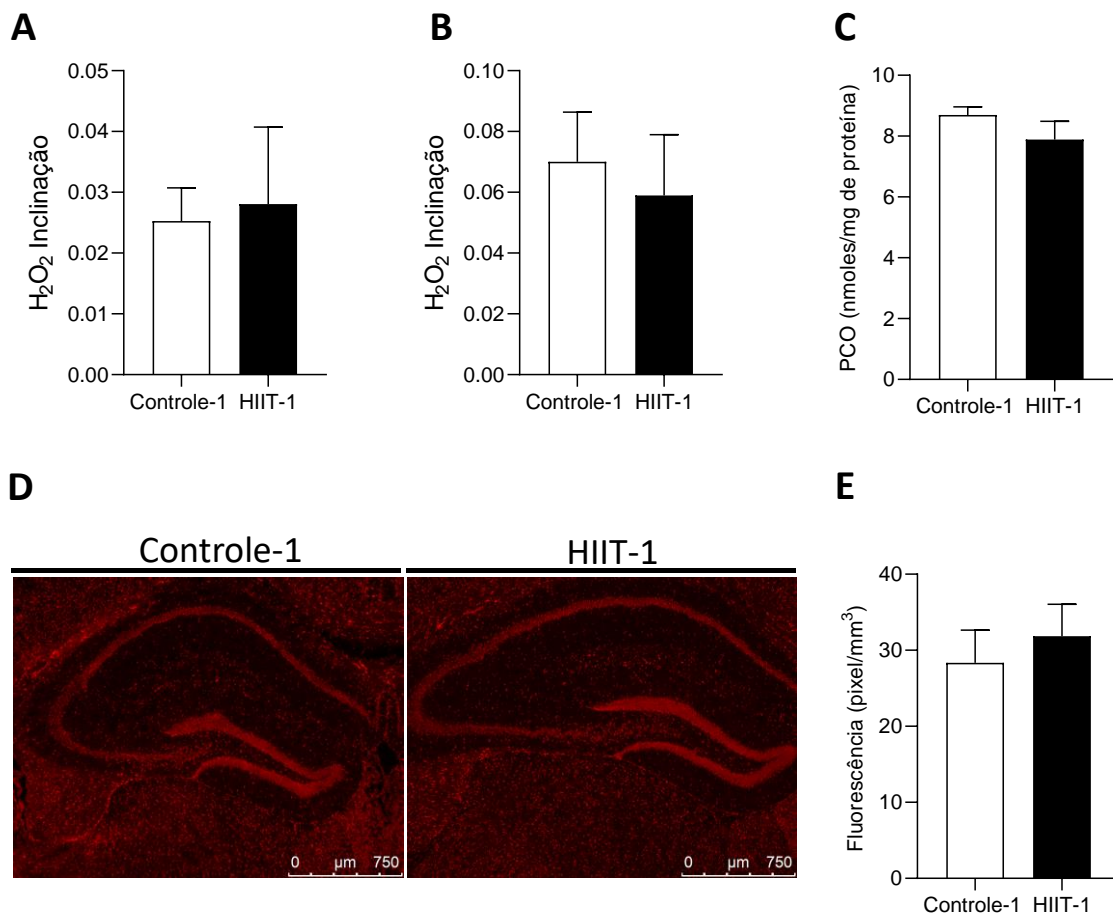


Figura 7 – Efeito de uma semana de HIIT em parâmetros redox. (A) Produção de H_2O_2 no hipocampo e (B) córtex (controle: n = 3; HIIT, n = 3); (C) Concentração de proteína carbonilada no hipocampo (controle: n = 4; HIIT, n = 4); (D) Fluorescência de DHE – ânion superóxido e (E) quantificação da fluorescência de DHE no giro denteado (controle: n = 4; HIIT, n = 4); Inclinação: variação da taxa de UF/tempo normalizado pelo conteúdo de proteína (UF: unidades de fluorescência). A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de *Student* com $p < 0,05$.

4.3. HIIT durante cinco semanas reduziu a produção de ânion superóxido no giro denteado e reduziu o declínio em DCX

A análise da produção de H_2O_2 no hipocampo e no córtex mostra que houve diferenças entre o grupo controle-5 e HIIT-5, assim como no conteúdo de proteína carbonilada com cinco semanas de treinamento (Figura 8A, 8B e 8C). Entretanto, 5 semanas de HIIT levou ao aumento da produção de ânion superóxido especificamente no giro denteado (Figura 8D e 8E).

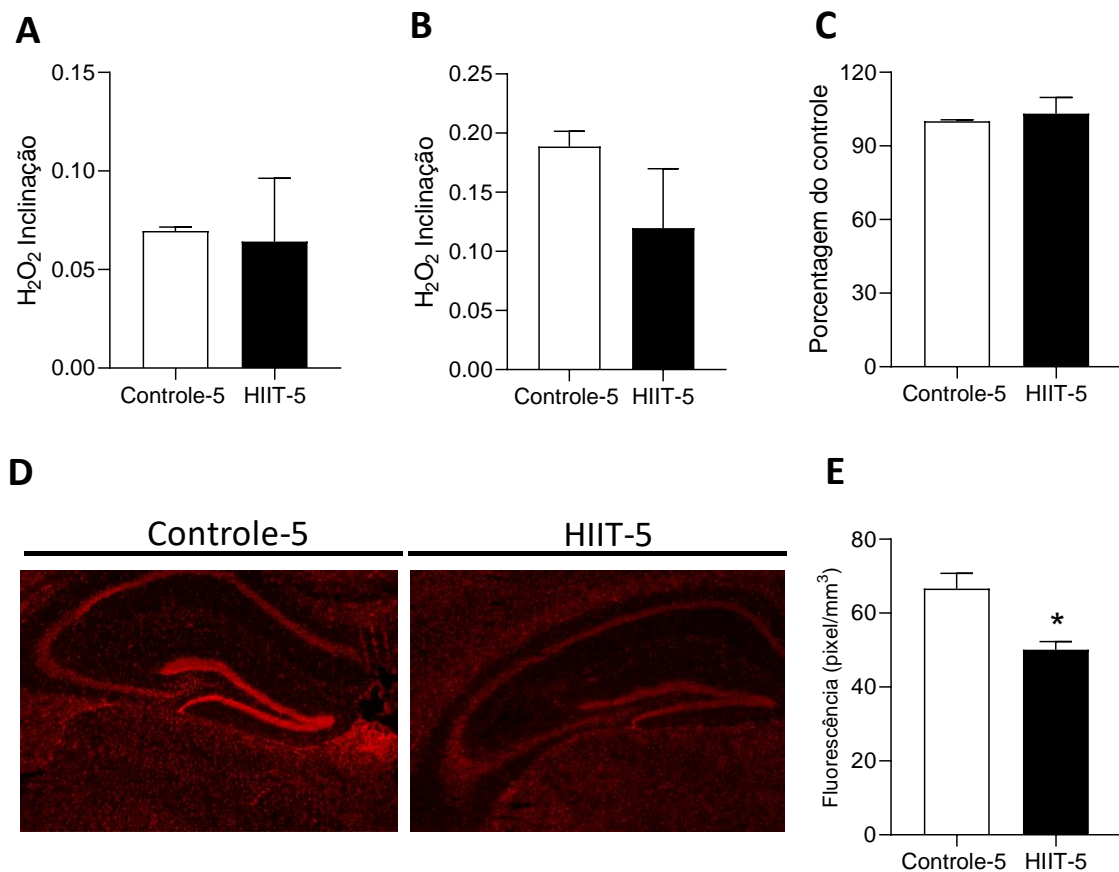


Figura 8. Efeito de cinco semanas de HIIT no estado redox do hipocampo, córtex e giro denteado. (A) Produção de H_2O_2 no hipocampo e (B) cortex cerebral (controle-5, n = 3; HIIT-1, n =

3); (C) concentração de proteína carbonilada no hipocampo de animais controle e animais treinados (controle-5, n = 4; HIIT-5, n = 5); (D) Imagem representativa da marcação com a sonda DHE no giro denteado e (E) quantificação da fluorescência da reação da sonda DHE com o ânion superóxido do giro denteado (controle-5, n = 4; HIIT-5, n = 4). Inclinação: variação na taxa de UF/t normalizada pelo conteúdo de proteína (UF: unidade de fluorescência). A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* de *Student*. * $p < 0,05$.

Embora o conteúdo de DCX foi similar após 5 semanas no grupo controle-5 e HIIT-5 (Figura 8 A), a análise ao longo do tempo demonstrou que a densidade de células positivas para DCX no giro denteado foi menor no grupo controle com 5 semanas em comparação com grupo basal (Figura 8 B). Entretanto, o declínio na quantidade de células positivas para DCX no grupo HIIT-5 em relação ao grupo basal foi menor em relação ao grupo controle-5. Em adição à atenuação da queda na quantidade de DCX no grupo HIIT-5 ao longo do tempo, foi observado um aumento no conteúdo mitocondrial na quinta semana de treinamento (marcado pela atividade de citrato sintase; Figura 8 C).

Embora o conteúdo de DCX fosse semelhante após cinco semanas nos grupos controle e treinado (Fig. 9A), a análise ao longo do tempo mostrou que na quinta semana o conteúdo de DCX no giro denteado foi menor no grupo controle em comparação com a linha de base (Fig. 9B). Além disso, com o atraso no declínio do DCX, o treinamento aumentou o conteúdo mitocondrial na quinta semana. (Marcado pela atividade da Citrato Sintase – Figura 9C).

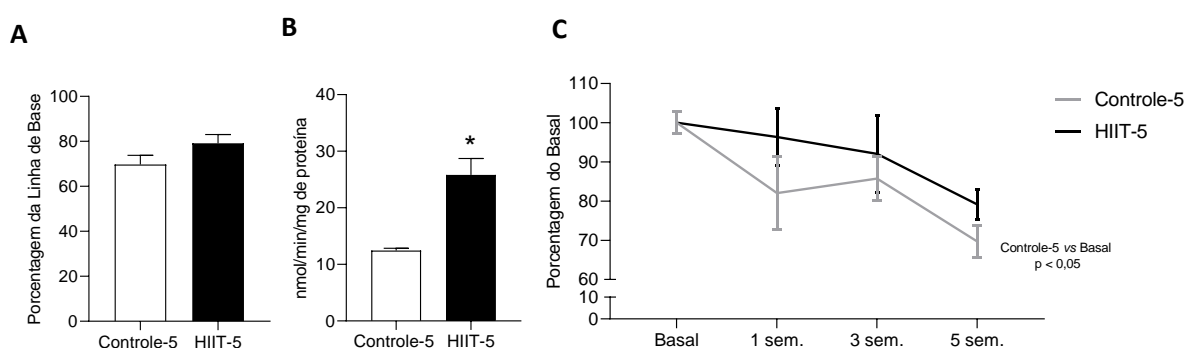


Figura 9. Efeito de 5 semanas de HIIT na formação de células neuronais imaturas e no conteúdo de marcador de mitocôndria no hipocampo. (A) Quantificação de DCX no giro denteado (controle-5, n = 10; HIIT-5, n = 10) de animais controle e animais treinados. (B) Atividade da citrato sintase (controle-5, n = 3; HIIT-5, n = 4) no hipocampo de animais sedentários e animais treinados; (C) Quantificação de DCX no giro denteado ao longo de todo o curso temporal: Basal (n = 6), 1 semana (controle-1, n = 6; HIIT-1, n = 7), três semanas (controle-3, n = 6; HIIT-3, n = 8) e 5 semanas (controle-5, n = 10; HIIT-5, n = 10). A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* de *Student*

para as figuras A e B. Anova de duas vias com teste post hoc de Bonferroni foi utilizado na figura C. *
 $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho utilizamos o modelo experimental de HIIT para avaliarmos o efeito do treinamento de alta intensidade na plasticidade neuronal. Nossos resultados demonstraram que uma semana de HIIT modulou a plasticidade neuronal sem alterar o estado redox do hipocampo dos camundongos. Adicionalmente, uma redução no ânion superóxido no giro denteado foi observada somente na quinta semana de HIIT, tempo em que não foi encontrada diferença significativa no conteúdo de DCX entre os grupos sedentário e treinado. Porém, ao comparar os grupos ao longo do tempo foi observado que HIIT por cinco semanas previne o declínio de células DCX positivas no giro denteado. O conteúdo mitocondrial permaneceu elevado em uma e cinco semanas de treinamento.

O exercício físico, assim como o enriquecimento ambiental (conceito utilizado em modelo animal) é um dos principais estímulos para a neurogênese hipocampal adulta ((BICK-SANDER; STEINER; WOLF; BABU *et al.*, 2006; KRONENBERG; BICK-SANDER; BUNK; WOLF *et al.*, 2006; SNYDER; GLOVER; SANZONE; KAMHI *et al.*, 2009). Paralelamente à neurogênese hipocampal adulta, o exercício promove diversas adaptações no hipocampo, como aumento de volume, formação de dendritos, síntese de fatores neurotróficos (*e.g.* BDNF, VEGF) e a formação de novas redes de sinalização neuronal (EL-SAYES; HARASYM; TURCO; LOCKE *et al.*, 2019). Essas adaptações tem sido relacionadas à diversos ganhos comportamentais, como melhoras na capacidade de memória, aprendizado, redução de ansiedade e depressão, tanto em modelos experimentais com animais como também em seres humanos (CHO; SHIN; SONG; JUN *et al.*, 2013; HOVEIDA; ALAEI; ORYAN; PARIVAR *et al.*, 2011; SEO; CHO; SHIN; KIM *et al.*, 2013).

Trabalhos sugerem uma rede de adaptações ao longo da vida capaz de prevenir ou retardar o aparecimento de doenças neurodegenerativas (LLORENS-MARTIN, 2018; SELKOE, 2012). Kempermann tem postulado que o estilo de vida, como o nível educacional, as relações sociais e o exercício físico podem formar neurônios ao longo da vida adulta que potencialmente ajudam a regular desafios que se tornam mais complexos no processo de envelhecimento (KEMPERMANN, 2008; 2019; KEMPERMANN; GAGE; AIGNER; SONG *et al.*, 2018).

Nossas análises por meio de espectrometria de massas mostraram que uma semana de HIIT aumentou os biomarcadores para a proliferação e diferenciação de neurônios no hipocampo. A proteína MCM2, aumentada após o treinamento, é uma proteína chave no complexo de replicação celular (VON BOHLEN UND HALBACH, 2011). Essa proteína

forma um complexo durante a replicação do DNA na divisão celular e tem sido usada como um marcador de proliferação celular (HANNA-MORRIS; BADVIE; COHEN; MCCULLOUGH *et al.*, 2009; WANG; YANG; ZHANG; SMITH *et al.*, 2019; WILLIAMS; ROMANOWSKI; MORRIS; MADINE *et al.*, 1998). No trabalho de Hanna-Morris e colaboradores (2009) foi demonstrado que a proteína MCM2 é um melhor discriminador do aumento na proliferação de células da mucosa adjacente ao câncer colorretal em comparação com a proteína Ki67 (HANNA-MORRIS; BADVIE; COHEN; MCCULLOUGH *et al.*, 2009). Paralelamente, MCM2 pode ser mais apropriada para a marcação de proliferação neuronal que Ki-67 (HANNA-MORRIS; BADVIE; COHEN; MCCULLOUGH *et al.*, 2009; VON BOHLEN UND HALBACH, 2011).

Corroborando, o aumento da razão pAkt/t-Akt indica uma modulação no crescimento celular após uma semana de HIIT. Assim, Akt contribui para mediar processos celulares, incluindo a proliferação e crescimento celular (WANG; YANG; ZHANG; SMITH *et al.*, 2019), enquanto a desregulação da sinalização do Akt no cérebro esteve ligada a doenças neuronais (SURAL-FEHR; SINGH; CANTUTI-CATELVETRI; ZHU *et al.*, 2019; WANG; YANG; ZHANG; SMITH *et al.*, 2019). Além disso, a inibição da via de sinalização PI3K-Akt impediu a plasticidade sináptica induzida pelo exercício e a neurogênese no giro denteado (BRUEL-JUNGERMAN; VEYRAC; DUFOUR; HORWOOD *et al.*, 2009). No entanto, o exercício físico pode favorecer o aumento da proliferação de células precursoras (EADIE; REDILA; CHRISTIE, 2005; KRONENBERG; BICK-SANDER; BUNK; WOLF *et al.*, 2006) e a sobrevivência de neurônios imaturos (SNYDER; GLOVER; SANZONE; KAMHI *et al.*, 2009). Os efeitos do exercício físico no hipocampo foram observados através do aumento do número de neurônios e da liberação de fatores neuroquímicos excitatórios (ANDERSON; RAPP; BAEK; MCCLOSKEY *et al.*, 2000; RADAK; KANEKO; TAHARA; NAKAMOTO *et al.*, 2001). Nesse sentido, observamos um aumento nos neurônios imaturos, através do marcador DCX após uma semana de treinamento, bem como um aumento no BDNF, um fator importante na neuroplasticidade induzida pelo exercício (COTMAN; BERCHTOLD, 2002; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012).

A proteína DCX, envolvida na modulação e estabilização de microtúbulos como parte do mecanismo de migração neuronal é utilizada na marcação de células neuronais imaturas (AYANLAJA; XIONG; GAO; JI *et al.*, 2017). Trabalhos utilizando o exercício físico em diferentes momentos da vida adulta (*e.g.* adolescentes e adultos) mostraram que o início do estímulo físico em fases iniciais da vida promove o aumento no conteúdo de DCX (O'LEARY; HOBAN; MURPHY; O'LEARY *et al.*, 2019). Em contraposição, outros trabalhos tem

demonstrado a diminuição na neurogênese após o nascimento (SNYDER, 2019). Embora tenhamos observado que o conteúdo de DCX foi similar após 5 semanas no grupo controle e HIIT (figura 9 A), a análise ao longo do tempo demonstrou que a densidade de células positivas para DCX no giro denteado foi menor no grupo controle com 5 semanas em comparação com a linha de base (figura 9 B).

Outro biomarcador importante da neuroplasticidade durante o desenvolvimento e na vida adulta é o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (MONTEGGIA; BARROT; POWELL; BERTON *et al.*, 2004; POO, 2001). Evidências tem mostrado que o BDNF promove a formação de novas células da glia (CHENG; COKSAYGAN; TANG; KHATRI *et al.*, 2007), a formação de novos neurônios (BENRAISS; CHMIELNICKI; LERNER; ROH *et al.*, 2001), a formação de novas sinapses (BINDER; SCHARFMAN, 2004) e a formação de novos vasos sanguíneos (LIN; HUNG; CHEN; TSOU *et al.*, 2014). Muitos trabalhos tem demonstrado que intervenções de longa duração com exercício levam ao aumento de BDNF (LECKIE; OBERLIN; VOSS; PRAKASH *et al.*, 2014; SEIFERT; BRASSARD; WISSENBERG; RASMUSSEN *et al.*, 2010; ZOLADZ; PILC; MAJERCZAK; GRANDYS *et al.*, 2008). Outras proteínas envolvidas na proliferação de células tronco neuronais como Ki67, nestin, HuR e Glast não aumentaram durante uma semana de treinamento de alta intensidade (figura 4).

A plasticidade neuronal, sobretudo a neurogênese, é acompanhada de alterações metabólicas caracterizadas predominantemente por metabolismo glicolítico em células precursoras neuronais para metabolismo oxidativo em células diferenciadas em neurônios (CHO; KWON; PAK; SEOL *et al.*, 2006; CHUNG; DZEJA; FAUSTINO; PEREZ-TERZIC *et al.*, 2007; FOLMES; NELSON; MARTINEZ-FERNANDEZ; ARRELL *et al.*, 2011). Nesse sentido, verificamos que o treinamento aumentou o conteúdo mitocondrial no hipocampo, indicando uma mudança de metabolismo predominantemente glicolítico para metabolismo predominantemente aeróbico. Uma semana de HIIT aumentou o conteúdo de VDAC, uma proteína exclusivamente mitocondrial (ZILOCCHI; FINZI; LUALDI; SESSA *et al.*, 2018), enquanto que cinco semanas de HIIT aumento a atividade da citrato sintase, uma enzima localizada na matriz mitocondrial e comumente utilizada como biomarcador do conteúdo mitocondrial (MOYES; MATHIEU-COSTELLO; TSUCHIYA; FILBURN *et al.*, 1997). Em concordância com os achados do presente trabalho, evidências demonstram que o estado metabólico é importante na modulação da plasticidade e diferenciação neuronal (CHENG; HOU; MATTSON, 2010).

Em adição, a neurogênese hipocampal adulta tem sido associada a um aumento na massa mitocondrial (MOYES; MATHIEU-COSTELLO; TSUCHIYA; FILBURN *et al.*, 1997; VAYSSIERE; CORDEAU-LOSSOUARN; LARCHER; BASSEVILLE *et al.*, 1992) e no metabolismo oxidativo, incluindo a regulação positiva do mtDNA, a capacidade da cadeia de transporte de elétrons e a atividade das enzimas geradoras de NADH (CHENG; HOU; MATTSON, 2010; WANG; OSENBROCH; SKINNES; ESBENSEN *et al.*, 2010), enquanto outros trabalhos demonstram prejuízo na maturação neuronal em células com mitocôndrias disfuncionais (AIMONE; LI; LEE; CLEMENSON *et al.*, 2014; BECKERVORDERSANDFORTH, 2017).

O metabolismo mitocondrial e o estado redox estão intimamente relacionados à proliferação e diferenciação neuronal (BECKERVORDERSANDFORTH, 2017). As evidências apontam para um aumento transitório na produção de EROs como um sinal para a formação de novos neurônios (HOU; MATTSON; CHENG, 2013; LE BELLE; OROZCO; PAUCAR; SAXE *et al.*, 2011; WALTON; SHIN; TAJINDA; HEUSNER *et al.*, 2012), indicando que explosões de EROs são necessárias para a proliferação neuronal, enquanto níveis excessivos de EROs podem impedir a diferenciação intermediária de células progenitoras em neuroblastos (BECKERVORDERSANDFORTH, 2017). Embora nossos resultados tenham demonstrado que a enzima antioxidante mitocondrial SOD2 diminuiu no hipocampo após uma semana de HIIT (uma adaptação que poderia favorecer o aumento de EROs), a condição redox celular não foi alterada, conforme monitorado por vários marcadores (H_2O_2 , ânion superóxido, proteínas oxidadas) no hipocampo ou giro denteado. Por outro lado, nossos resultados demonstram que cinco semanas de HIIT reduz o conteúdo de ânion superóxido no giro denteado, enquanto que não há alterações entre o grupo sedentário e treinado para H_2O_2 no hipocampo e no córtex. Dessa forma, as evidências demonstram um papel sinalizador das EROs na plasticidade neuronal (ESPOSITO; AMMENDOLA; FARAONIO; RUSSO *et al.*, 2004; HOU; MATTSON; CHENG, 2013).

Ao analisar os limites para as concentrações de EROs como uma molécula sinalizadora, é observado ainda um campo de estudo em aberto (OKAMOTO; YAMAMURA; LIU; MIN-CHUL *et al.*, 2015). Trabalhos utilizando animais com diferentes idades mostram que a super-expressão da enzima antioxidante superóxido dismutase extracelular leva à aumento na plasticidade sináptica e na memória de animais idosos (HU; SERRANO; OURY; KLANN, 2006). Por outro lado, a super expressão de SOD nos animais jovens levou à uma diminuição na plasticidade sináptica e memória. Assim, pode-se concluir

aparentemente que é necessário um estado ótimo dos níveis de EROs para a regulação de processos neuroplásticos.

Considerando o aumento no conteúdo mitocondrial nos grupos treinados, é sugestivo que o exercício físico pode modular o metabolismo do microambiente neurogênico com consequente plasticidade neuronal. Ainda, o aumento no número de mitocôndria pode contribuir de forma preponderante na modulação do ambiente redox do hipocampo e do giro denteado, visto sua conhecida função na regulação do estado redox celular (KHACHO; CLARK; SVOBODA; AZZI *et al.*, 2016; XAVIER; MORGADO; SOLA; RODRIGUES, 2014). Investigações têm demonstrado que o exercício aeróbico reduz o estresse oxidativo e aumenta a neurogênese no hipocampo após 2 semanas (OKAMOTO; YAMAMURA; LIU; MIN-CHUL *et al.*, 2015), 3-4 semanas (JI; JI; SUN; LI *et al.*, 2014; VANZELLA; NEVES; VIZUETE; ARISTIMUNHA *et al.*, 2017), 6-8 semanas (INOUE; HANAOKA; NISHIJIMA; OKAMOTO *et al.*, 2015; JOUKAR; VAHIDI; FARSINEJAD; ASADI-SHEKAARI *et al.*, 2017) ou até 3 meses (ABHIJIT; TRIPATHI; BHAGYA; SHANKARANARAYANA RAO *et al.*, 2018) de treinamento. Por outro lado, 6 semanas de HIIT reduziu o estresse oxidativo no hipocampo, aumentou a concentração de antioxidantes e o conteúdo de BDNF no hipocampo (FREITAS; ROCHA-VIEIRA; SOARES; NONATO *et al.*, 2018).

O perfil mitocondrial e redox no hipocampo induzido pelo HIIT em uma semana (animais com 15 semanas de idade; Figura 7) se repetiu após cinco semanas de treinamento (animais com 19 semanas de idade; Figura 8), indicando uma manutenção das adaptações durante o período de treinamento.

Em resumo, nosso protocolo de HIIT foi capaz de aumentar a plasticidade neuronal e o conteúdo mitocondrial, independentemente das alterações no estado redox em uma semana de treinamento, enquanto que a alteração do estado redox (Figura 8) foi observada apenas com cinco semanas de HIIT. Nosso trabalho propõe que a modulação na plasticidade neuronal por exercício de alta intensidade, especialmente no giro denteado, é dependente do estado redox em condições em que há excesso de EROs (*e.g.* durante o envelhecimento), mas não em condições que o estado redox celular não apresenta um excesso na formação de EROs (*e.g.* em condições de vida mais jovem).

6. REFERÊNCIAS

ABHIJIT, S.; TRIPATHI, S. J.; BHAGYA, V.; SHANKARANARAYANA RAO, B. S. *et al.* Antioxidant action of grape seed polyphenols and aerobic exercise in improving neuronal number in the hippocampus is associated with decrease in lipid peroxidation and hydrogen peroxide in adult and middle-aged rats. **Exp Gerontol**, 101, p. 101-112, Jan 2018.

AIMONE, J. B.; LI, Y.; LEE, S. W.; CLEMENSON, G. D. *et al.* Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. **Physiol Rev**, 94, n. 4, p. 991-1026, Oct 2014.

ANDERSON, B. J.; RAPP, D. N.; BAEK, D. H.; MCCLOSKEY, D. P. *et al.* Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. **Physiol Behav**, 70, n. 5, p. 425-429, Sep 15 2000.

AYANLAJA, A. A.; XIONG, Y.; GAO, Y.; JI, G. *et al.* Distinct Features of Doublecortin as a Marker of Neuronal Migration and Its Implications in Cancer Cell Mobility. **Front Mol Neurosci**, 10, p. 199, 2017.

BECKER, S. A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. **Hippocampus**, 15, n. 6, p. 722-738, 2005.

BECKERVORDERSDANFORTH, R. Mitochondrial Metabolism-Mediated Regulation of Adult Neurogenesis. **Brain Plast**, 3, n. 1, p. 73-87, Nov 9 2017.

BENRAISS, A.; CHMIELNICKI, E.; LERNER, K.; ROH, D. *et al.* Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. **J Neurosci**, 21, n. 17, p. 6718-6731, Sep 1 2001.

BERCHTOLD, N. C.; KESSLAK, J. P.; COTMAN, C. W. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene regulation by exercise and the medial septum. **J Neurosci Res**, 68, n. 5, p. 511-521, Jun 1 2002.

BERGMANN, O.; LIEBL, J.; BERNARD, S.; ALKASS, K. *et al.* The age of olfactory bulb neurons in humans. **Neuron**, 74, n. 4, p. 634-639, May 24 2012.

BICK-SANDER, A.; STEINER, B.; WOLF, S. A.; BABU, H. *et al.* Running in pregnancy transiently increases postnatal hippocampal neurogenesis in the offspring. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 10, p. 3852-3857, Mar 7 2006.

BINDER, D. K.; SCHARFMAN, H. E. Brain-derived neurotrophic factor. **Growth Factors**, 22, n. 3, p. 123-131, Sep 2004.

BOLDRINI, M.; FULMORE, C. A.; TARTT, A. N.; SIMEON, L. R. *et al.* Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. **Cell Stem Cell**, 22, n. 4, p. 589-599.e585, Apr 5 2018.

BONAGUIDI, M. A.; SONG, J.; MING, G. L.; SONG, H. A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. **Curr Opin Neurobiol**, 22, n. 5, p. 754-761, Oct 2012.

BONAGUIDI, M. A.; WHEELER, M. A.; SHAPIRO, J. S.; STADEL, R. P. *et al.* In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. **Cell**, 145, n. 7, p. 1142-1155, Jun 24 2011.

BOYNE, P.; DUNNING, K.; CARL, D.; GERSON, M. *et al.* High-intensity interval training in stroke rehabilitation. **Top Stroke Rehabil**, 20, n. 4, p. 317-330, Jul-Aug 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; VEYRAC, A.; DUFOUR, F.; HORWOOD, J. *et al.* Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. **PLoS One**, 4, n. 11, p. e7901, Nov 19 2009.

BRUNNE, B.; ZHAO, S.; DEROUICHE, A.; HERZ, J. *et al.* Origin, maturation, and astroglial transformation of secondary radial glial cells in the developing dentate gyrus. **Glia**, 58, n. 13, p. 1553-1569, Oct 2010.

CAHILL, S. P.; COLE, J. D.; YU, R. Q.; CLEMANS-GIBBON, J. *et al.* Differential Effects of Extended Exercise and Memantine Treatment on Adult Neurogenesis in Male and Female Rats. **Neuroscience**, 390, p. 241-255, Oct 15 2018.

CHENG, A.; COKSAYGAN, T.; TANG, H.; KHATRI, R. *et al.* Truncated tyrosine kinase B brain-derived neurotrophic factor receptor directs cortical neural stem cells to a glial cell fate by a novel signaling mechanism. **J Neurochem**, 100, n. 6, p. 1515-1530, Mar 2007.

CHENG, A.; HOU, Y.; MATTSON, M. P. Mitochondria and neuroplasticity. **ASN Neuro**, 2, n. 5, p. e00045, Oct 4 2010.

CHO, H. S.; SHIN, M. S.; SONG, W.; JUN, T. W. *et al.* Treadmill exercise alleviates short-term memory impairment in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **J Exerc Rehabil**, 9, n. 3, p. 354-361, 2013.

CHO, Y. M.; KWON, S.; PAK, Y. K.; SEOL, H. W. *et al.* Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 348, n. 4, p. 1472-1478, Oct 6 2006.

CHUNG, S.; DZEJA, P. P.; FAUSTINO, R. S.; PEREZ-TERZIC, C. *et al.* Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, 4 Suppl 1, p. S60-67, Feb 2007.

COLCOMBE, S. J.; KRAMER, A. F.; ERICKSON, K. I.; SCALF, P. *et al.* Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 9, p. 3316-3321, Mar 2 2004.

COLLINS, S. J.; TUMPACH, C.; GROVEMAN, B. R.; DREW, S. C. *et al.* Prion protein cleavage fragments regulate adult neural stem cell quiescence through redox modulation of mitochondrial fission and SOD2 expression. **Cell Mol Life Sci**, 75, n. 17, p. 3231-3249, Sep 2018.

COLOMBO, G.; CLERICI, M.; GARAVAGLIA, M. E.; GIUSTARINI, D. *et al.* A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 1019, p. 178-190, Apr 15 2016.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, 25, n. 6, p. 295-301, Jun 2002.

CURTIS, M. A.; KAM, M.; NANNMARK, U.; ANDERSON, M. F. *et al.* Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. **Science**, 315, n. 5816, p. 1243-1249, Mar 2 2007.

DEISSEROTH, K.; SINGLA, S.; TODA, H.; MONJE, M. *et al.* Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. **Neuron**, 42, n. 4, p. 535-552, May 27 2004.

DU, L. L.; WANG, L.; YANG, X. F.; WANG, P. *et al.* Transient Receptor Potential-canonical 1 is Essential for Environmental Enrichment-Induced Cognitive Enhancement and Neurogenesis. **Mol Neurobiol**, 54, n. 3, p. 1992-2002, Apr 2017.

E, L.; BURNS, J. M.; SWERDLOW, R. H. Effect of high-intensity exercise on aged mouse brain mitochondria, neurogenesis, and inflammation. **Neurobiol Aging**, 35, n. 11, p. 2574-2583, Nov 2014.

EADIE, B. D.; REDILA, V. A.; CHRISTIE, B. R. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. **J Comp Neurol**, 486, n. 1, p. 39-47, May 23 2005.

EL-SAYES, J.; HARASYM, D.; TURCO, C. V.; LOCKE, M. B. *et al.* Exercise-Induced Neuroplasticity: A Mechanistic Model and Prospects for Promoting Plasticity. **Neuroscientist**, 25, n. 1, p. 65-85, Feb 2019.

ERICKSON, K. I.; LECKIE, R. L.; WEINSTEIN, A. M. Physical activity, fitness, and gray matter volume. **Neurobiol Aging**, 35 Suppl 2, p. S20-28, Sep 2014.

ERICKSON, K. I.; VOSS, M. W.; PRAKASH, R. S.; BASAK, C. *et al.* Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 7, p. 3017-3022, Feb 15 2011.

ERIKSSON, P. S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSSON, T.; ALBORN, A. M. *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nat Med**, 4, n. 11, p. 1313-1317, Nov 1998.

ERNST, A.; ALKASS, K.; BERNARD, S.; SALEHPOUR, M. *et al.* Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. **Cell**, 156, n. 5, p. 1072-1083, Feb 27 2014.

ESPOSITO, F.; AMMENDOLA, R.; FARAONIO, R.; RUSSO, T. *et al.* Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence. **Neurochem Res**, 29, n. 3, p. 617-628, Mar 2004.

FACA, V.; CORAM, M.; PHANSTIEL, D.; GLUKHOVA, V. *et al.* Quantitative analysis of acrylamide labeled serum proteins by LC-MS/MS. **J Proteome Res**, 5, n. 8, p. 2009-2018, Aug 2006.

FOLMES, C. D.; NELSON, T. J.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A.; ARRELL, D. K. *et al.* Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. **Cell Metab**, 14, n. 2, p. 264-271, Aug 3 2011.

FRANKLIN, K.; PAXINOS, G. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact - 5th Edition. 1997.

FREITAS, D. A.; ROCHA-VIEIRA, E.; DE SOUSA, R. A. L.; SOARES, B. A. *et al.* High-intensity interval training improves cerebellar antioxidant capacity without affecting cognitive functions in rats. **Behav Brain Res**, 376, p. 112181, Dec 30 2019.

FREITAS, D. A.; ROCHA-VIEIRA, E.; SOARES, B. A.; NONATO, L. F. *et al.* High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. **Physiol Behav**, 184, p. 6-11, Feb 1 2018.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. **J Biol Chem**, 272, n. 30, p. 18515-18517, Jul 25 1997.

GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, 287, n. 5457, p. 1433-1438, Feb 25 2000.

GE, S.; GOH, E. L.; SAILOR, K. A.; KITABATAKE, Y. *et al.* GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. **Nature**, 439, n. 7076, p. 589-593, Feb 2 2006.

GIBALA, M. J.; LITTLE, J. P.; MACDONALD, M. J.; HAWLEY, J. A. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. **J Physiol**, 590, n. 5, p. 1077-1084, Mar 1 2012.

GOULD, E.; TANAPAT, P.; HASTINGS, N. B.; SHORS, T. J. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. **Trends Cogn Sci**, 3, n. 5, p. 186-192, May 1999.

HANNA-MORRIS, A.; BADVIE, S.; COHEN, P.; MCCULLOUGH, T. *et al.* Minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) is a stronger discriminator of increased proliferation in mucosa adjacent to colorectal cancer than Ki-67. **J Clin Pathol**, 62, n. 4, p. 325-330, Apr 2009.

HIRABARA, S. M.; FOLADOR, A.; FIAMONCINI, J.; LAMBERTUCCI, R. H. *et al.* Fish oil supplementation for two generations increases insulin sensitivity in rats. **J Nutr Biochem**, 24, n. 6, p. 1136-1145, Jun 2013.

HODGE, R. D.; KOWALCZYK, T. D.; WOLF, S. A.; ENCINAS, J. M. *et al.* Intermediate progenitors in adult hippocampal neurogenesis: Tbr2 expression and coordinate regulation of neuronal output. **J Neurosci**, 28, n. 14, p. 3707-3717, Apr 2 2008.

HOU, Y.; MATTSON, M. P.; CHENG, A. Permeability transition pore-mediated mitochondrial superoxide flashes regulate cortical neural progenitor differentiation. **PLoS One**, 8, n. 10, p. e76721, 2013.

HOVEIDA, R.; ALAEI, H.; ORYAN, S.; PARIVAR, K. *et al.* Treadmill running improves spatial memory in an animal model of Alzheimer's disease. **Behav Brain Res**, 216, n. 1, p. 270-274, Jan 1 2011.

HU, D.; SERRANO, F.; OURY, T. D.; KLANN, E. Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. **J Neurosci**, 26, n. 15, p. 3933-3941, Apr 12 2006.

HUBNER, L.; VOELCKER-REHAGE, C. Does physical activity benefit motor performance and learning of upper extremity tasks in older adults? - A systematic review. **Eur Rev Aging Phys Act**, 14, p. 15, 2017.

HURST, C.; SCOTT, J. P. R.; WESTON, K. L.; WESTON, M. High-Intensity Interval Training: A Potential Exercise Countermeasure During Human Spaceflight. **Front Physiol**, 10, p. 581, 2019.

HYODO, K.; DAN, I.; SUWABE, K.; KYUTOKU, Y. *et al.* Acute moderate exercise enhances compensatory brain activation in older adults. **Neurobiol Aging**, 33, n. 11, p. 2621-2632, Nov 2012.

INOUE, K.; HANAOKA, Y.; NISHIJIMA, T.; OKAMOTO, M. *et al.* Long-term mild exercise training enhances hippocampus-dependent memory in rats. **Int J Sports Med**, 36, n. 4, p. 280-285, Apr 2015.

INTLEKOFER, K. A.; COTMAN, C. W. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, 57, p. 47-55, Sep 2013.

JEE, Y. S.; KO, I. G.; SUNG, Y. H.; LEE, J. W. *et al.* Effects of treadmill exercise on memory and c-Fos expression in the hippocampus of the rats with intracerebroventricular injection of streptozotocin. **Neurosci Lett**, 443, n. 3, p. 188-192, Oct 10 2008.

JI, J. F.; JI, S. J.; SUN, R.; LI, K. *et al.* Forced running exercise attenuates hippocampal neurogenesis impairment and the neurocognitive deficits induced by whole-brain irradiation via the BDNF-mediated pathway. **Biochem Biophys Res Commun**, 443, n. 2, p. 646-651, Jan 10 2014.

JIMENEZ-MALDONADO, A.; RENTERIA, I.; GARCIA-SUAREZ, P. C.; MONCADA-JIMENEZ, J. *et al.* The Impact of High-Intensity Interval Training on Brain Derived Neurotrophic Factor in Brain: A Mini-Review. **Front Neurosci**, 12, p. 839, 2018.

JOUKAR, S.; VAHIDI, R.; FARSINEJAD, A.; ASADI-SHEKAARI, M. *et al.* Ameliorative Effects of Endurance Exercise with Two Different Intensities on Nandrolone Decanoate-Induced Neurodegeneration in Rats: Involving Redox and Apoptotic Systems. **Neurotox Res**, 32, n. 1, p. 41-49, Jul 2017.

KEMPERMANN, G. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? **Trends Neurosci**, 31, n. 4, p. 163-169, Apr 2008.

KEMPERMANN, G. Making DEEP Sense of Lifestyle Risk and Resilience. **Front Aging Neurosci**, 11, p. 171, 2019.

KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H.; AIGNER, L.; SONG, H. *et al.* Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. **Cell Stem Cell**, 23, n. 1, p. 25-30, Jul 5 2018.

KEMPERMANN, G.; GAST, D.; KRONENBERG, G.; YAMAGUCHI, M. *et al.* Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. **Development**, 130, n. 2, p. 391-399, Jan 2003.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, 386, n. 6624, p. 493-495, Apr 3 1997.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. **J Neurosci**, 18, n. 9, p. 3206-3212, May 1 1998.

KENTTA, G.; HASSMEN, P. Overtraining and recovery. A conceptual model. **Sports Med**, 26, n. 1, p. 1-16, Jul 1998.

KHACHO, M.; CLARK, A.; SVOBODA, D. S.; AZZI, J. *et al.* Mitochondrial Dynamics Impacts Stem Cell Identity and Fate Decisions by Regulating a Nuclear Transcriptional Program. **Cell Stem Cell**, 19, n. 2, p. 232-247, Aug 4 2016.

KIM, B. K.; SHIN, M. S.; KIM, C. J.; BAEK, S. B. *et al.* Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing neurogenesis in amyloid beta-induced Alzheimer disease rats. *In: J Exerc Rehabil*, 2014. v. 10, p. 2-8.

KIM, S. E.; KO, I. G.; PARK, C. Y.; SHIN, M. S. *et al.* Treadmill and wheel exercise alleviate lipopolysaccharide-induced short-term memory impairment by enhancing neuronal maturation in rats. **Mol Med Rep**, 7, n. 1, p. 31-36, Jan 2013.

KRONENBERG, G.; BICK-SANDER, A.; BUNK, E.; WOLF, C. *et al.* Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. **Neurobiol Aging**, 27, n. 10, p. 1505-1513, Oct 2006.

KRONENBERG, G.; REUTER, K.; STEINER, B.; BRANDT, M. D. *et al.* Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. **J Comp Neurol**, 467, n. 4, p. 455-463, Dec 22 2003.

KUZNETSOV, A. V.; LASSNIG, B.; GNAIGER, E. **Laboratory Protocol Citrate Synthase Mitochondrial Marker Enzyme**. Mitochondrial Physiology Network, 2010.

LAUTENSCHLAGER, N. T.; COX, K. L.; FLICKER, L.; FOSTER, J. K. *et al.* Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. **Jama**, 300, n. 9, p. 1027-1037, Sep 3 2008.

LE BELLE, J. E.; OROZCO, N. M.; PAUCAR, A. A.; SAXE, J. P. *et al.* Proliferative neural stem cells have high endogenous ROS levels that regulate self-renewal and neurogenesis in a PI3K/Akt-dependant manner. **Cell Stem Cell**, 8, n. 1, p. 59-71, Jan 7 2011.

LECKIE, R. L.; OBERLIN, L. E.; VOSS, M. W.; PRAKASH, R. S. *et al.* BDNF mediates improvements in executive function following a 1-year exercise intervention. **Front Hum Neurosci**, 8, p. 985, 2014.

LI, B.; LIANG, F.; DING, X.; YAN, Q. *et al.* Interval and continuous exercise overcome memory deficits related to beta-Amyloid accumulation through modulating mitochondrial dynamics. **Behav Brain Res**, 376, p. 112171, Dec 30 2019.

LIN, C. Y.; HUNG, S. Y.; CHEN, H. T.; TSOU, H. K. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor increases vascular endothelial growth factor expression and enhances angiogenesis in human chondrosarcoma cells. **Biochem Pharmacol**, 91, n. 4, p. 522-533, Oct 15 2014.

LLORENS-MARTIN, M. Exercising New Neurons to Vanquish Alzheimer Disease. **Brain Plast**, 4, n. 1, p. 111-126, Dec 12 2018.

LONG, J. M.; HOLTZMAN, D. M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. **Cell**, 179, n. 2, p. 312-339, Oct 3 2019.

LOURENCO, M. V.; FROZZA, R. L.; DE FREITAS, G. B.; ZHANG, H. *et al.* Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. **Nat Med**, 25, n. 1, p. 165-175, Jan 2019.

MACLEAN, B.; TOMAZELA, D. M.; SHULMAN, N.; CHAMBERS, M. *et al.* Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. **Bioinformatics**, 26, n. 7, p. 966-968, Apr 1 2010.

MARZUCA-NASSR, G. N.; VITZEL, K. F.; DE SOUSA, L. G.; MURATA, G. M. *et al.* Effects of high EPA and high DHA fish oils on changes in signaling associated with protein metabolism induced by hindlimb suspension in rats. **Physiol Rep**, 4, n. 18, Sep 2016.

MESHI, D.; DREW, M. R.; SAXE, M.; ANSORGE, M. S. *et al.* Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nat Neurosci**, 9, n. 6, p. 729-731, Jun 2006.

MONTEGGIA, L. M.; BARROT, M.; POWELL, C. M.; BERTON, O. *et al.* Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 29, p. 10827-10832, Jul 20 2004.

MOYES, C. D.; MATHIEU-COSTELLO, O. A.; TSUCHIYA, N.; FILBURN, C. *et al.* Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. **Am J Physiol**, 272, n. 4 Pt 1, p. C1345-1351, Apr 1997.

NOKIA, M. S.; LENSU, S.; AHTIAINEN, J. P.; JOHANSSON, P. P. *et al.* Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. **J Physiol**, 594, n. 7, p. 1855-1873, Apr 1 2016.

O'LEARY, J. D.; HOBAN, A. E.; MURPHY, A.; O'LEARY, O. F. *et al.* Differential effects of adolescent and adult-initiated exercise on cognition and hippocampal neurogenesis. **Hippocampus**, 29, n. 4, p. 352-365, Apr 2019.

OKAMOTO, M.; YAMAMURA, Y.; LIU, Y. F.; MIN-CHUL, L. *et al.* Hormetic effects by exercise on hippocampal neurogenesis with glucocorticoid signaling. **Brain Plast**, 1, n. 1, p. 149-158, Oct 9 2015.

OSWALD, M. C. W.; GARNHAM, N.; SWEENEY, S. T.; LANDGRAF, M. Regulation of neuronal development and function by ROS. **FEBS Lett**, 592, n. 5, p. 679-691, Mar 2018.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nat Rev Endocrinol**, 8, n. 8, p. 457-465, Apr 3 2012.

POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat Rev Neurosci**, 2, n. 1, p. 24-32, Jan 2001.

QIAN, H. R.; YANG, Y. Neuron differentiation and neuritogenesis stimulated by N-acetylcysteine (NAC). **Acta Pharmacol Sin**, 30, n. 7, p. 907-912, Jul 2009.

RADAK, Z.; IHASZ, F.; KOLTAI, E.; GOTO, S. *et al.* The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise. **Free Radic Res**, 48, n. 1, p. 84-92, Jan 2014.

RADAK, Z.; KANEKO, T.; TAHARA, S.; NAKAMOTO, H. *et al.* Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. **Neurochem Int**, 38, n. 1, p. 17-23, Jan 2001.

RADAK, Z.; KUMAGAI, S.; TAYLOR, A. W.; NAITO, H. *et al.* Effects of exercise on brain function: role of free radicals. **Appl Physiol Nutr Metab**, 32, n. 5, p. 942-946, Oct 2007.

RADAK, Z.; SUZUKI, K.; HIGUCHI, M.; BALOGH, L. *et al.* Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. **Free Radic Biol Med**, 98, p. 187-196, Sep 2016.

RAICHLIN, D. A.; BHARADWAJ, P. K.; FITZHUGH, M. C.; HAWS, K. A. *et al.* Differences in Resting State Functional Connectivity between Young Adult Endurance Athletes and Healthy Controls. **Front Hum Neurosci**, 10, p. 610, 2016.

RHARASS, T.; LANTOW, M.; GBANKOTO, A.; WEISS, D. G. *et al.* Ascorbic acid alters cell fate commitment of human neural progenitors in a WNT/beta-catenin/ROS signaling dependent manner. **J Biomed Sci**, 24, n. 1, p. 78, Oct 16 2017.

ROSENZWEIG, M. R.; BENNETT, E. L. Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. **Behav Brain Res**, 78, n. 1, p. 57-65, Jun 1996.

SAHAY, A.; HEN, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. **Nat Neurosci**, 10, n. 9, p. 1110-1115, Sep 2007.

SANAI, N.; TRAMONTIN, A. D.; QUINONES-HINOJOSA, A.; BARBARO, N. M. *et al.* Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. **Nature**, 427, n. 6976, p. 740-744, Feb 19 2004.

SANTARELLI, L.; SAXE, M.; GROSS, C.; SURGET, A. *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, 301, n. 5634, p. 805-809, Aug 8 2003.

SEIFERT, T.; BRASSARD, P.; WISSENBERG, M.; RASMUSSEN, P. *et al.* Endurance training enhances BDNF release from the human brain. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 298, n. 2, p. R372-377, Feb 2010.

SELKOE, D. J. Preventing Alzheimer's disease. **Science**, 337, n. 6101, p. 1488-1492, Sep 21 2012.

SEO, T. B.; CHO, H. S.; SHIN, M. S.; KIM, C. J. *et al.* Treadmill exercise improves behavioral outcomes and spatial learning memory through up-regulation of reelin signaling pathway in autistic rats. **J Exerc Rehabil**, 9, n. 2, p. 220-229, Apr 2013.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem**, 150, n. 1, p. 76-85, Oct 1985.

SNYDER, J. S. Recalibrating the Relevance of Adult Neurogenesis. **Trends Neurosci**, 42, n. 3, p. 164-178, Mar 2019.

SNYDER, J. S.; GLOVER, L. R.; SANZONE, K. M.; KAMHI, J. F. *et al.* The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells. **Hippocampus**, 19, n. 10, p. 898-906, Oct 2009.

SNYDER, J. S.; HONG, N. S.; MCDONALD, R. J.; WOJTOWICZ, J. M. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. **Neuroscience**, 130, n. 4, p. 843-852, 2005.

SO, J. H.; HUANG, C.; GE, M.; CAI, G. *et al.* Corrigendum: Intense Exercise Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis But Not Spatial Discrimination. **Front Cell Neurosci**, 13, p. 303, 2019.

SORRELLS, S. F.; PAREDES, M. F.; CEBRIAN-SILLA, A.; SANDOVAL, K. *et al.* Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. **Nature**, 555, n. 7696, p. 377-381, Mar 15 2018.

SPALDING, K. L.; BERGMANN, O.; ALKASS, K.; BERNARD, S. *et al.* Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. **Cell**, 153, n. 6, p. 1219-1227, Jun 6 2013.

STEINER, J. L.; MURPHY, E. A.; MCCLELLAN, J. L.; CARMICHAEL, M. D. *et al.* Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. **J Appl Physiol (1985)**, 111, n. 4, p. 1066-1071, Oct 2011.

SURAL-FEHR, T.; SINGH, H.; CANTUTI-CATELVETRI, L.; ZHU, H. *et al.* Inhibition of the IGF-1-PI3K-Akt-mTORC2 pathway in lipid rafts increases neuronal vulnerability in a genetic lysosomal glycosphingolipidosis. **Dis Model Mech**, 12, n. 5, May 23 2019.

SUWABE, K.; BYUN, K.; HYODO, K.; REAGH, Z. M. *et al.* Rapid stimulation of human dentate gyrus function with acute mild exercise. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 41, p. 10487-10492, Oct 9 2018.

SUWABE, K.; HYODO, K.; BYUN, K.; OCHI, G. *et al.* Aerobic fitness associates with mnemonic discrimination as a mediator of physical activity effects: evidence for memory flexibility in young adults. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 5140, Jul 11 2017.

TOZUKA, Y.; FUKUDA, S.; NAMBA, T.; SEKI, T. *et al.* GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. **Neuron**, 47, n. 6, p. 803-815, Sep 15 2005.

VAN PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. **Neuromolecular Med**, 10, n. 2, p. 128-140, 2008.

VANZELLA, C.; NEVES, J. D.; VIZUETE, A. F.; ARISTIMUNHA, D. *et al.* Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats. **Behav Brain Res**, 334, p. 78-85, Sep 15 2017.

VAYSSIERE, J. L.; CORDEAU-LOSSOUARN, L.; LARCHER, J. C.; BASSEVILLE, M. *et al.* Participation of the mitochondrial genome in the differentiation of neuroblastoma cells. **In Vitro Cell Dev Biol**, 28a, n. 11-12, p. 763-772, Nov-Dec 1992.

VON BOHLEN UND HALBACH, O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. **Cell Tissue Res**, 345, n. 1, p. 1-19, Jul 2011.

WALTON, N. M.; SHIN, R.; TAJINDA, K.; HEUSNER, C. L. *et al.* Adult neurogenesis transiently generates oxidative stress. **PLoS One**, 7, n. 4, p. e35264, 2012.

WANG, B. Z.; YANG, J. J.; ZHANG, H.; SMITH, C. A. *et al.* AMPK Signaling Regulates the Age-Related Decline of Hippocampal Neurogenesis. **Aging Dis**, 10, n. 5, p. 1058-1074, Oct 2019.

WANG, W.; OSENBROCH, P.; SKINNES, R.; ESBENSEN, Y. *et al.* Mitochondrial DNA integrity is essential for mitochondrial maturation during differentiation of neural stem cells. **Stem Cells**, 28, n. 12, p. 2195-2204, Dec 2010.

WILLIAMS, G. H.; ROMANOWSKI, P.; MORRIS, L.; MADINE, M. *et al.* Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, n. 25, p. 14932-14937, Dec 8 1998.

WISLOFF, U.; HELGERUD, J.; KEMI, O. J.; ELLINGSEN, O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO₂ max and cardiac hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 280, n. 3, p. H1301-1310, Mar 2001.

XAVIER, J. M.; MORGADO, A. L.; SOLA, S.; RODRIGUES, C. M. Mitochondrial translocation of p53 modulates neuronal fate by preventing differentiation-induced mitochondrial stress. **Antioxid Redox Signal**, 21, n. 7, p. 1009-1024, Sep 1 2014.

YAN, Y.; WLADYKA, C.; FUJII, J.; SOCKANATHAN, S. Prdx4 is a compartment-specific H₂O₂ sensor that regulates neurogenesis by controlling surface expression of GDE2. **Nat Commun**, 6, p. 7006, May 6 2015.

ZHOU, M.; DIWU, Z.; PANCHUK-VOLOSHINA, N.; HAUGLAND, R. P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Anal Biochem**, 253, n. 2, p. 162-168, Nov 15 1997.

ZILOCCHI, M.; FINZI, G.; LUALDI, M.; SESSA, F. *et al.* Mitochondrial alterations in Parkinson's disease human samples and cellular models. **Neurochem Int**, 118, p. 61-72, Sep 2018.

ZIMMERMAN, B.; SUTTON, B. P.; LOW, K. A.; FLETCHER, M. A. *et al.* Cardiorespiratory fitness mediates the effects of aging on cerebral blood flow. **Front Aging Neurosci**, 6, p. 59, 2014.

ZOLADZ, J. A.; PILC, A.; MAJERCZAK, J.; GRANDYS, M. *et al.* Endurance training increases plasma brain-derived neurotrophic factor concentration in young healthy men. **J Physiol Pharmacol**, 59 Suppl 7, p. 119-132, Dec 2008.

Anexo 1. Lista de proteínas analizadas por LC-MS/MS

| Proteína | Peptídeo precursor (Seq.) | z | m/z | T.R. | L. P. | N. F. | Íons Fragmentados (Sequence, z, m/z) |
|---------------|---------------------------|---|-----------|-------|---------|-------|--|
| Sodm | GDVTTQVALQPALK | 2 | 721332431 | 9,89 | 75-88 | 3 | QVALQPALK, 1,967593492 – VALQPALK, 1, 839534915 – VALQPALK, 1, 740466501 |
| GSK-3 β | TPPEAIALCSR | 2 | 608206991 | 16,3 | 308-318 | 3 | EAIALCSR, 1, 919466577 - AIALCSR, 1, 790423984 - IALCSR, 1, 719386871 |
| | LLEYTPRAR | 2 | 532613036 | 7,2 | 319-327 | 3 | EYTPRAR, 1, 837410108 - YTPRAR, 1, 708367515 - TPRAR, 1, 545304186 - |
| Ki67 | ESGELSEGSEK | 2 | 576578481 | 9,44 | 869-879 | 3 | GELSEGSEK, 1, 935431632 - LSEGSEK, 1, 749367575 - SEGSEK, 1, 636283511 |
| HuR | SLFSSIGEVESAK | 2 | 677748771 | 14,71 | 37-49 | 3 | SSIGEVESAK, 1, 1006505131 - SIGEVESAK, 1, 919473102 - GEVESAK, 1, 71935701 |
| | DANLYISGLPR | 2 | 610190766 | 13,04 | 104-114 | 3 | LYISGLPR, 1, 918540728 - YISGLPR, 1, 805456664 - YISGLPR, 1, 642393336 |
| Syn1 | GSHSQSSSPGALTLGR | 3 | 514884429 | 4,82 | 430- | 3 | PGALTLGR, 1, 784467563 - GALTLGR, 1, 6874148 - |

| | | | | | | | |
|--------|-----------------------|---|------------|-------|-----------|---|---|
| | | | | | 445 | | LTLGR, 1, 559356222 |
| | QASISGPAPTK | 2 | 529095841 | 2,19 | 565-575 | 3 | SISGPAPTK, 1, 857472708 - SGPAPTK, 1, 657356616 - GPAPTK, 1, 570324588 |
| Glast | TTTNVLGDSL GAGIVEHLSR | 3 | 681089923 | 17,4 | 479-498 | 3 | GAGIVEHLSR, 1, 1038569068 - GIVEHLSR, 1, 910510491 - VEHLSR, 1, 740404963 |
| MAP2 | DQGGAGEGLSR | 2 | 524035116 | 1,53 | 32-42 | 3 | GGAGEGLSR, 1, 803400606 - GAGEGLSR, 1, 746379142 - GEGLSR, 1, 618320565 |
| | SGILVPSEK | 2 | 465544841 | 6,43 | 1634-1642 | 3 | ILVPSEK, 1, 785476731 - LVPSEK, 1, 672392667 - VPSEK, 1, 559308603 |
| | LINQPLPDLK | 2 | 576195121 | 11,21 | 1662-1671 | 3 | NQPLPDLK, 1, 924514908 - QPLPDLK, 1, 81047198 - PLPDLK, 1, 682413403 |
| NeuN | GFGFVTFENSADADR | 2 | 817354996 | 16,1 | 155-159 | 2 | TFENSADADR, 1, 1125480707 - FENSADADR, 1, 1024433028 - ENSADADR, 1, 877364615 |
| Nestin | ADDELAALR | 2 | 487529636 | 8,25 | 55-63 | 3 | DDELAALR, 1, 902457787 - ELAALR, 1, 672403901 - LAALR, 1, 543361307 |
| TOM20 | FFLEEIQLGEELLAQGDY EK | 2 | 1186811961 | 26,46 | 68-87 | 3 | LAQGDY EK, 1, 923446888 - AQGDY EK, 1, 810362824 - QGDY EK, 1, 73932571 |
| DCX | GNPSAAAGPK | 2 | 435477076 | 5,59 | 275-284 | 3 | NPSAAAGPK, 1, 812426093 - SAAAGPK, 1, 601330401 - AAGPK, 1, 443261259 |

| | | | | | | | |
|----------------|--------------------|---|-----------|-------|---------|---|---|
| BDNF | DADLYTSR | 2 | 470993071 | 12,79 | 87-94 | 3 | DLYTSR, 1, 754372994 - LYTSR, 1, 639346051 - YTSR, 1, 526261987 - |
| | IDTSCVCTLTIK | 2 | 706339786 | 12,79 | 234-245 | 3 | CVCTLTIK, 1, 994506 - VCTLTIK, 1, 834475351 - CTLTIK, 1, 735406937 |
| MCM2 | GLALALFGGEPK | 2 | 587198031 | 14,62 | 493-504 | 3 | LALFGGEPK, 1, 931524744 - LFGGEPK, 1, 747403566 - FGGEPK, 1, 634319502 |
| VDAC | LTFDSSFSPNTGK | 2 | 701256486 | 10,92 | 109-121 | 3 | DSSFSPNTGK, 1, 103946908 - SSFSPNTGK, 1, 924442137 - FSPNTGK, 1, 75037808 - |
| | LTLSALLDGK | 2 | 516118686 | 17,33 | 269-278 | 3 | LSALLDGK, 1, 816482545 - SALLDGK, 1, 703398481 - ALLDGK, 1, 616366452 |
| β -actin | VAPEEHPVLLTEAPLNPK | 3 | 506533103 | 4,6 | 359-371 | 3 | LTEAPLNPK, 1, 982556772 - TEAPLNPK, 1, 869472708 - EAPLNPK, 1, 76842503 |
| | QEYDESGPSIVHR | 3 | 677748771 | 14,74 | 34-49 | | PSIVHR, 1, 708415134 - SIVHR, 1, 61136237 - IVHR, 1, 524330342 |

Nota: T.R. = Tempo de retenção (minutos); L. P. = Localização da proteína; N. F. = Número de fragmentos.