

Juliano Custódio Vieira Júnior

Exercício físico aeróbico de endurance aumenta os níveis de dopamina e Irisina encefálica e produz comportamento do tipo-antidepressivo em camundongos

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina para obtenção do Grau
de Bacharelado em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Peña
Cunha

Coorientador: Prof. Dr. Alcir Luiz
Dafré

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vieira Jr., Juliano

Exercício físico aeróbico aumenta os níveis de dopamina e Irisina encefálica e produz comportamento do tipo antidepressivo em camundongos / Juliano Vieira Jr. ; orientador, Maurício Peña Cunha, coorientador, Alcir Luiz Dafré, 2020.

79 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Bioquímica. 3. Depressão. 4. Exercício Físico. 5. Irisina. I. Peña Cunha, Maurício. II. Dafré, Alcir Luiz. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Juliano Custódio Vieira Júnior

Exercício físico aeróbico de endurance aumenta os níveis de dopamina e Irisina encefálica e produz comportamento do tipo-antidepressivo em camundongos

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharelada em Ciências Biológicas e aprovada em sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 29 de janeiro de 2020.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Maurício Peña Cunha
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Débora da Luz Scheffer
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira
Universidade Federal de Santa Catarina

MSc. Jozimar Carlos Szczepanik
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a todos que se importam com a ciência e aos camundongos utilizados como modelo experimental desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Devo agradecer primeiramente à minha mãe, Luciana, por toda a paciência e apoio durante esses meus longos anos de graduação. Por sempre compreender a importância dos estudos e colocar a educação dos seus quatro filhos como prioridade em sua vida, mesmo em fases difíceis. E aos meus irmãos e padrasto, pela união e por serem fonte de motivação para mim, na busca de conhecimento e perspectivas melhores.

Com carinho, reconheço a importância da minha querida companheira, Júlia, durante este percurso acadêmico. Suas percepções, devaneios e sensibilidade perante o mundo instigam minha curiosidade. Obrigado por sempre incentivar, com muita eloquência, a busca pelos meus sonhos mais sinceros. E por toda compreensão e amor.

Ao meu orientador e amigo, Maurício, agradeço especialmente pela paciência nos últimos três anos, pelos ensinamentos durante a iniciação científica, por confiar na execução do meu trabalho, por todas discussões de cunho científico e conversas fiadas. Sempre lembrarei com carinho.

Ao Jota, por compartilhar seus conhecimentos em neurociência e instigar em mim um maior interesse pela área.

Às minhas colegas de iniciação científica e futuras biólogas, Babi, Monique, Laura por toda ajuda e conselhos nos momentos de insegurança e dúvidas. Especialmente à Ingrid, que muito me ajudou com a execução dos experimentos. Uma grande admiração por sua cordialidade!

Bem como, a todos do Laboratório de Defesas Celulares (LabDef) da UFSC, por criarem um ambiente confortável, onde pude me desenvolver como futuro cientista. Por todos os momentos de troca de conhecimentos, trabalho em equipe e descontração. Evidencio meus agradecimentos ao professor e chefe do laboratório, dr. Alcir Luiz Dafre, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa e confiança.

Com grande satisfação faço meus sinceros agradecimentos aos meus amigos e grandes companheiros de graduação, Monique, Wilker, Júlio, Eike e Karen, por todos os momentos ilustres de muita ironia que passamos. E a todas as muitas pessoas que tive oportunidade de conhecer e me tornar amigo durante este percurso. Vocês são especiais!

Finalmente, agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, por ser pública e de muita qualidade me propiciou momentos significativos de crescimento pessoal e profissional.

“O homem deve saber que de nenhum outro lugar, mas apenas do encéfalo, vem a alegria, o prazer, o riso e a diversão, o pesar e o luto, o desalento e a lamentação. E por meio dele, de uma maneira especial, nós adquirimos sabedoria e conhecimento, enxergamos e ouvimos, sabemos o que é justo e injusto, o que é bom e o que é ruim, o que é doce e o que é insípido... E pelo mesmo órgão nos tornamos loucos e delirantes, e medos e terrores nos assombram... Todas essas coisas nós temos de suportar quando o encéfalo não está sadio... Nesse sentido, opino que é o encéfalo quem exerce o maior poder no homem.” – Hipócrates, Da Doença Sagrada (Século IV a.C.).

RESUMO

O exercício físico é definido como todo movimento muscular que leva um gasto energético que ocorra de forma planejada, regular, repetitiva com o objetivo de melhora ou manutenção da aptidão física. A prática de exercício físico induz uma série de adaptações fisiológicas no organismo que ocorrem em diversos tecidos celulares como o músculo esquelético e cardíaco, ossos e o tecido nervoso. Os benefícios do exercício físico no sistema nervoso central (SNC) são bastante documentados na literatura científica, podendo ter ação neuroprotetora em diversas doenças mentais e neurológicas, como o transtorno depressivo maior. Entretanto, os mecanismos envolvidos na ação neuroprotetora do exercício físico na depressão ainda possuem muitas lacunas a serem estudadas. Desta maneira, em nosso estudo buscamos investigar os efeitos do exercício físico aeróbico de *endurance* na esteira sobre o comportamento, neuroplasticidade e no sistema redox de camundongos e a implicação da miocina Irisina nestes efeitos. Assim sendo, camundongos foram submetidos a um protocolo de exercício físico de *endurance* com duração de 45min, 5 vezes por semana, com uma carga inicial de 6m/min na primeira semana e com um acréscimo de 1m/min a cada semana de treinamento. 24 horas depois da última sessão de corrida, os animais passaram por uma bateria de testes comportamentais: teste nado forçado (TNF), teste suspensão pela cauda (TSC), teste do campo aberto (TCA), teste da borrifagem de sacarose (TBS), teste de preferência por sacarose (TPS). Concomitantemente aos testes comportamentais, dissecamos os músculos esqueléticos gastrocnêmio e quadríceps, os tecidos encefálicos hipocampo, estriado e córtex pré-frontal para futuras análises bioquímicas. Nossos resultados demonstraram que a prática de exercício físico teve efeito do tipo-antidepressivo, diminuindo o tempo de imobilidade no TNF e no TSC. No TCA observamos que os animais treinados apresentavam uma menor latência para dar o primeiro passo, ficavam maior tempo no centro do aparato, e executavam mais vezes o comportamento de auto-limpeza, indicando assim um efeito do tipo ansiolítico do nosso protocolo de exercício físico. Nas análises neuroquímicas, os resultados demonstraram que o exercício físico não alterou a atividade de enzimas antioxidantes e nem de marcadores oxidativos nos músculos esqueléticos e no encéfalo dos camundongos. Porém, os níveis de dopamina e de Irisina foram aumentados no córtex pré-frontal dos animais treinados. Desta maneira, concluímos neste trabalho que o protocolo de exercício físico aeróbico de *endurance* produz

efeito tipo antidepressivo e ansiolítico, e este efeito pode ser dependente da biodisponibilidade de dopamina e da miocina Irisina.

Palavras-chave: Exercício físico, depressão, Irisina, sistema redox.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias de formação de Espécies Reativas de Oxigênio.....	25
Figura 2. Sistema enzimático de detoxificação das EROs.....	26
Figura 3. Estrutura química do metilglioxal.....	28
Figura 4. Rotas metabólicas para formação do metilglioxal.....	29
Figura 5. Mecanismo de detoxificação do metilglioxal pelo ciclo das glioxalases.....	31
Figura 6. Síntese da Irisina.	37
Figura 7. Organograma do protocolo experimental.....	41
Figura 8. Teste do Campo Aberto.	42
Figura 9. Teste do nado forçado.	43
Figura 10. Teste suspensão pela cauda.	43
Figura 11. Teste de borrifagem de sacarose.	44
Figura 12. Teste de preferência pela sacarose.	45
Figura 13. Exercício físico aeróbico reduz o aumento de peso corporal de camundongos <i>Swiss</i>	50
Figura 14. Exercício físico aeróbico não altera a força dos animais.	51
Figura 15. Exercício físico aeróbico não altera a ambulação, mas produz efeito ansiolítico em camundongos <i>Swiss</i>	52
Figura 16. Exercício físico aeróbico produz efeito tipicamente antidepressivo em camundongos <i>Swiss</i>	53
Figura 17. Exercício Físico aeróbico não altera atividade enzimática no encéfalo dos camundongos <i>Swiss</i>	55
Figura 18. O exercício Físico aeróbico não acarretou lipoperoxidação no hipocampo e no córtex pré-frontal dos camundongos.	56
Figura 19. O exercício físico não teve efeito sob os níveis de MGO e nem no sistema de detoxificação do MGO.	57
Figura 20. O exercício físico aeróbico alterou os níveis de dopamina no córtex pré-frontal, porém não alterou em outras estruturas.	59

Figura 21. Os níveis de Irisina foram aumentadas com a prática de exercício físico no córtex pré-frontal, porém não alteraram nos músculos Gastrocnêmio e quadríceps e no hipocampo.**60**

Figura 22. Irisina atua na manutenção do peso através do aumento da expressão de UCP-1.**62**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sintomas do transtorno depressivo segundo o DSM-V.

Tabela 2. Solução tampão de lise

Tabela 3. Gel 15% para corrida

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT – Serotonina
AZ – Doença de alzheimer
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CAT – Catalase
DA – Dopamina
ECI – Estresse crônico induzido
FNDC5 – Fibronectina tipo III contendo 5
Glo I – Glioxalase I
Glo II – Glioxalase II
GPx – Glutaciona Peroxidase
GR – Glutaciona Redutase
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
MGO - Metilglioxal
NA - Noradrenalina
NRF2 – fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2
O₂⁻ – Ânion superóxido
OH⁻ – Radical hidroxila
PGC-1 α – Coativador-1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
SNC – Sistema nervoso central
SOD – Superóxido Dismutase
TBS – Teste borrifagem de sacarose
TFA – Teste de força de agarre
TNF – Teste nado forçado
Trx – Tiorredoxina
TrxR – Tiorredoxina Redutase
TSC – Teste suspensão pela cauda
UCP-1 – Proteína Desacopladora do tipo 1
WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Exercício Físico.....	23
1.2	Dano Oxidativo	24
1.3	Exercício Físico e Dano Oxidativo	27
1.4	Metilglioxal.....	28
1.5	Transtorno Depressivo Maior	32
1.6	Exercício Físico e Transtorno Depressivo.....	34
1.7	Irisina e o eixo músculo-encéfalo	34
2	OBJETIVOS.....	38
2.1	Objetivo geral.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
3	JUSTIFICATIVA.....	39
4	METODOLOGIA.....	40
4.1	Protocolo Experimental de Exercício Físico Aeróbico de <i>Endurance</i> na Esteira.....	41
4.2	Testes Comportamentais	41
4.2.1	Teste do campo aberto (TCA)	41
4.2.2	Teste do nado forçado (TNF)	42
4.2.3	Teste da suspensão pela cauda (TSC)	43
4.2.4	Teste de borrifagem de sacarose (TBS).....	43
4.2.5	Teste de preferência pela sacarose (TPS)	44
4.2.6	Teste de Força de agarre (TFA)	45
4.3	Análises Bioquímicas	45
4.3.1	Análise da atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)....	45
4.3.2	Análise da atividade da enzima Glutathione redutase (GR)	46
4.3.3	Mensuração da atividade da enzima tiorredoxina redutase (TrxR)	46

4.3.4	Mensuração da atividade da Catalase (CAT):	46
4.3.5	Mensuração da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) 46	
4.3.6	Análise da atividade da Glioxalase I (glo-1).....	47
4.3.7	Mensuração dos níveis de serotonina, noradrenalina, e dopamina no estriado, hipocampo e córtex cerebral:.....	47
4.3.8	Detecção dos níveis de proteínas por Western Blotting e Dot Blotting	47
4.4	Análise estatística.....	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Efeitos do Exercício Físico nos Aspectos Físicos dos Animais 50	
5.2	Efeitos do Exercício Físico no Campo Aberto	51
5.3	Efeitos do Exercício Físico no Comportamento do tipo- Depressivo e Anedônico.....	52
5.4	Efeitos do Exercício Físico no Sistema de Enzimas Antioxidante nas estruturas encefálicas.....	54
5.5	Efeitos do Exercício Físico nos Aductos de Malonaldeído e 4-HNE no encéfalo dos Camundongos.....	55
5.6	Efeitos do Exercício Físico em Parâmetros de Estresse Glicolítico	57
5.7	Efeitos do Exercício Físico nos Níveis das Monoaminas no Encéfalo dos Camundongos	58
5.8	Efeito do Exercício Físico no conteúdo proteico de Irisina no eixo músculo-encéfalo.....	59
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO.....	68
8	PERSPECTIVAS.....	69
9	REFERÊNCIAS.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Exercício Físico

Caspersen et. al (1985) primeiramente definiu atividade física como todo movimento muscular que gera gasto energético. Já o exercício foi definido como uma atividade física estruturada, planejada e repetitiva que aumenta ou mantém a aptidão física em geral, e tenha como objetivo melhora ou manutenção da saúde física ou mental. O exercício físico pode ser dividido em aeróbico, onde há consumo de oxigênio pelas células musculoesqueléticas, e anaeróbico onde a fonte de energia usada pelos músculos não depende do oxigênio (NIH, 2006).

O exercício físico aeróbico é um subtipo de exercício que ocorre de forma contínua e de intensidade leve, moderada ou intensa. Este tipo de exercício recruta diferentes grupos musculares e ao mesmo tempo gera um aumento no gasto energético tecidual. O gasto energético dos músculos esqueléticos no exercício físico pode aumentar cerca de 20 vezes durante o exercício anaeróbico e em torno de 50 vezes no exercício aeróbico. Ainda é demonstrado que o fluxo de O_2 é aumentado cerca de 100 vezes nos músculos esqueléticos de indivíduos submetidos ao exercício aeróbico (Clanton et al., 1999).

De uma forma geral, após uma única sessão de exercício, ocorre lesões miofibrilares e existe uma subsequente adaptação fisiológica frente a este desafio sendo necessário um tempo de recuperação adequado. Quando o tecido muscular passa por múltiplas sessões de exercício físico sem ter um tempo de recuperação adequado, os danos podem aumentar e levar a apoptose celular (Close et al., 2005). Estes danos podem ser caracterizados pelo aumento de várias substâncias no tecido muscular, dentre elas as reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – do inglês *ThioBarbituric Acid Reactive Substances*), malondialdeído (MDA), produtos de oxidação de proteínas e de DNA, e uma redução na expressão e atividade de enzimas antioxidantes (Finaud et. al., 2006; Reid, 2001) Entretanto, com a realização de exercício físico regularmente, as células do tecido muscular se adaptam aos processos de lesão tecidual através do aumento de mecanismos de proteção, como um aumento na expressão de defesas antioxidantes citado anteriormente (Reid, 2001; Sureda et. al., 2005; Schneider e Oliveira., 2005).

Especificamente, diversos estudos ao longo das últimas décadas vêm buscando compreender os efeitos biológicos do exercício físico no SNC, principalmente referente a síntese, recrutamento e sinalização de diversas moléculas no tecido nervoso. De fato, trabalhos demonstram que a ação

neuroprotetora do exercício físico envolve diversos mecanismos neurobiológicos, dentre eles a regulação do sistema redox (Sen et al. 2001; Miyazaki et al. 2001), melhoras na neurogênese hipocampal adulta (van Praag et al., 1999) e nos processos inflamatórios (Touyz e Schiffrin, 2006), dentre outras e estes parecem ser dependentes de uma modulação nos níveis do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF- do inglês *Brain-derived factory factor*), uma importante neurotrofina que tem ação no gênese, crescimento, maturação e sobrevivência de novos neurônios (Yamada et al., 2002).

1.2 Dano Oxidativo

Radicais livres são moléculas altamente reativas, que na sua última camada eletrônica possuem elétrons não emparelhados. Este desemparelhamento confere a alta reatividade dos radicais livres, pois essas moléculas acabam interagindo com outras moléculas para se estabilizarem, seguindo a regra do octeto, onde átomos tendem a se combinar para ficar com oito elétrons na última camada de valência (Halliwell e Gutteridge, 1990).

A molécula de oxigênio (O_2) é fundamental para a vida de todos organismos aeróbicos. Devido sua característica eletrofílica, o O_2 proporciona grandes produções de energia na respiração celular como o acceptor final de elétrons (Lehninger, 2011). Porém, o metabolismo do O_2 pode formar produtos intermediários, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO). As EROs constituem importantes processos fisiológicos, bioquímicos e metabólico para manutenção dos sistemas dos organismos. A produção de EROs ocorre através do metabolismo celular, proveniente de estímulos endógenos e exógeno. As principais vias de produção de EROS, a partir de estímulos endógenos, se dá pelos neutrófilos e macrófagos durante o processo inflamatório e pela respiração celular mitocondrial na geração de ATP (Ferreira et. al, 1997; Smith e Reid; 2006). Dentre os estímulos exógenos para produção de radicais livres, têm os xenobióticos, como o cigarro, fármacos, radiação UV e agrotóxicos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A metabolização completa do oxigênio ocorre pela sua redução tetravalente até formar água (H_2O). Neste processo de redução do O_2 uma pequena porcentagem do O_2 não é metabolizada totalmente na cadeia transportadora de elétrons, e acaba passando por redução univalente formando produtos intermediários: as EROs. O ânion superóxido (O_2^-) é formado quando O_2 molecular recebe um elétron. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado pela redução subsequente do O_2^- . O H_2O_2 é classificado

como um agente pró-oxidante não-radicalar por não ter um elétron desemparelhado na camada de valência. O H_2O_2 é um metabólito bastante deletério, podendo atravessar camadas lipídicas e interagir com membranas, sendo assim bastante tóxico para as células. O radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) é o radical mais reativo produzido na redução do O_2 , podendo inativar proteínas, interagir com DNA (causando diversas mutações de alguns genes), bem como acarretar lipoperoxidação das membranas celulares. A formação do radical $\text{OH}\cdot$, se dá a partir do H_2O_2 na presença de Ferro (Fe) e Cobre (Cu) pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (Ferreira e Matsubara, 1997; Koury e Donangelo, 2003; Schneider e Oliveira, 2004; Lehninger, 2011).

Desta maneira, a formação das EROs é bastante associada a doenças como a câncer, diabetes, cardiovasculares, neurodegenerativas e transtornos psiquiátricos.

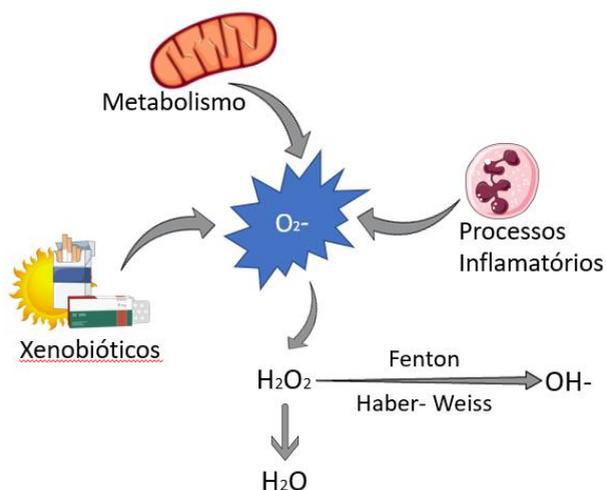


Figura 1. Principais vias de formação de Espécies Reativas de Oxigênio.

Abreviaturas: Ânion Superóxido (O_2^-), Peroxido de Hidrogênio (H_2O_2), Radical Hidroxil ($\text{OH}\cdot$). Fonte: do autor.

Para reduzir ou inibir os efeitos das EROs, os organismos aeróbicos possuem complexos sistemas de defesas antioxidantes. Os agentes dotados de capacidade antioxidante são quaisquer substâncias que diminui, inibe ou previne os danos oxidativos a moléculas. Os antioxidantes são classificados em enzimáticos, o qual vale ressaltar as enzimas superóxido dismutase

(SOD), glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT), tiorredoxina redutase (TrxR) e glutationa redutase (GR); e em não-enzimáticos, que podem ser de origem dietética, como o ácido ascórbico (Vitamina C), tocoferol (Vitamina E), flavonoides, dentre outros, ou de origem endógena, como a glutationa (GSH) e a tiorredoxina (Trx) principalmente (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As SODs são um conjunto de enzimas de extrema importância na neutralização das EROs nos seres vivos aeróbicos, elas são responsáveis por dismutar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 e O_2 (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A CAT está presente na maioria das células aeróbicas, de modo geral, encontrada mais significativamente nos peroxissomos. A CAT é responsável por detoxificar o H_2O_2 em H_2O e O_2 , e é encontrada principalmente em eritrócitos e no fígado (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A GPx, assim como a CAT, é responsável por catalisar a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 , ela também reduz outros peróxidos orgânicos, como o peróxido de cumeno. A ação da GPx, depende da GSH que é reduzida à glutationa oxidada (GSSG). Para regenerar os níveis de GSH, a enzima GR, reduz a GSSG em GSH a partir da oxidação do NADPH proveniente do ciclo das pentoses (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Devido não haver um sistema de defesa contra o OH^- , é de suma importância a manutenção do sistema redox para evitar sua formação, e por sua vez, danos severos as células (Halliwell e Gutteridge, 2007).

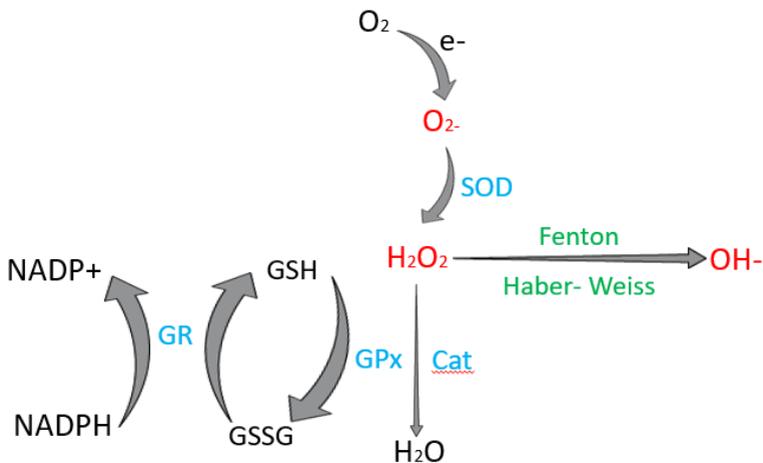


Figura 2. Sistema enzimático de detoxificação das EROs. A superóxido dismutase (SOD) é responsável por dismutar o O_2^- em H_2O_2 . O H_2O_2 por sua vez, é detoxificado pela catalase (Cat) e pela Glutaciona Peroxidase (GPx) em H_2O . A detoxificação do H_2O_2 em H_2O pela GPx ocorre pela utilização de 2 Glutationas em sua forma reduzida (GSH), o qual após o processo de detoxificação ficam conjugada em sua forma oxidada (GSSG). O restabelecimento das GSH depende da enzima Glutaciona Redutase (GR), o qual doa H^+ para a GSSG a partir, de NADPH proveniente da via das pentoses. Fonte: do autor.

1.3 Exercício Físico e Dano Oxidativo

É reportado em estudos com animais, *in vitro* e em humanos que a contração muscular leva um aumento transiente da produção de EROs (Davies et al., 1982; Neary et al., 1992; Schneider e Irigaray, 2008). Durante uma sessão de exercício físico aeróbico, existe um aumento acentuado do consumo de oxigênio pelo organismo, inclusive na captação do O_2 pelo tecido muscular, o qual pode chegar a ser 100 vezes maior do que no estado de repouso. Desta forma, tais alterações metabólicas do consumo do O_2 acarretam em um aumento de produção de EROs. Como na respiração celular uma pequena porcentagem do O_2 (1-2%) passa por uma redução univalente através do radical ubiquinona na sua forma reduzida (Q^-) formando o ânion superóxido, é assumido desta forma que o exercício físico aumenta os níveis de EROs através da respiração celular (Clanton et al., 1999). Também é demonstrado que durante o exercício físico existe um fluxo de produção de EROs através de um aumento na atividade da enzima Xantina oxidase, que por sua vez forma O_2^- como subproduto (Cooper et al., 2002). Outro mecanismo de formação de EROs durante o exercício físico, se dá pela resposta inflamatória no tecido lesado pela atividade física. Os neutrófilos ao se infiltrarem no tecido muscular, produzem a enzima NADPH oxidase, catalisando a formação de O_2^- no tecido (Touyz e Schiffrin, 2006). Estes aumentos na produção de EROs durante o exercício físico acaba por desencadear ativação de sinalização celular, de regulação de genes e expressão de proteínas que agem como defesas antioxidantes das células, desta maneira protegendo o organismo das ações oxidantes das EROs.

Na literatura científica, a relação entre o exercício físico e o estresse oxidativo possuem muitas lacunas em aberto, pois existe uma variabilidade de resultados, dependente do modelo de estudo, do tipo e da intensidade do protocolo de exercício físico. Neste sentido, estudos com ciclistas profissionais demonstraram que o exercício físico intenso durante uma competição em montanhas, aumentou os níveis de malondialdeído, um

indicador de lipoperoxidação, no plasma sanguíneo. (Sureda et. al., 2005). Sureda, avaliou que este aumento do MDA está relacionado com aumento de H₂O₂. Em um trabalho recente, Effting et. al. (2019) demonstraram que um protocolo de exercício físico de resistência durante 8 semanas, após uma dieta hipercalórica por 26 semanas, não produziu alteração em biomarcadores de lipoperoxidação no tecido cardíaco de camundongos. Entretanto, no mesmo trabalho, demonstraram que o exercício físico aumentou a atividade da SOD nos animais treinados. Outros trabalhos também demonstram que o exercício físico crônico melhora a adaptação antioxidante no indivíduo. Merry e Ristow (2016) sugeriram que o exercício físico aeróbico pode estimular a translocação do NRF2 (do inglês - *nuclear factor erythroid 2- related factor 2*) do citosol ao núcleo e assim regulam a biogênese mitocondrial e as defesas antioxidantes do músculo esquelético. Um estudo demonstrou que as enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD, tiveram suas atividades aumentadas no músculo sóleo após uma sessão de levantamento de peso em ratos (Uchiyama et. al., 2006). Uma das adaptações em decorrência dos aumentos transitórios de superóxido é o aumento da expressão de SOD para manutenção da homeostase celular (Reid, 2001).

Embora o sistema da Tiorredoxina (Trx) ainda seja pouco conhecido, sabe-se que esta enzima protege células e tecidos do dano oxidativo (Arnér e Holmgren, 2000). Além da Trx, o sistema da Trx também compreende a tioredoxina redutase (TrxR) e NADPH (Holmgren, 1985). Tung et. al (2015), demonstrou um aumento da atividade da TrxR nos rins e no fígado de camundongos velhos submetidos a um protocolo de exercício físico aeróbico. Também já foi demonstrado em humanos, que o exercício físico aeróbico de intensidade moderada a alta, aumenta a atividade da Trx e da TrxR em células sanguíneas (Beltran Valls et al., 2014).

1.4 Metilglioxal

O 2-oxopropanal (CH₃COCHO) também conhecido como metilglioxal (MGO) é um α -cetoaldeído formado por diferentes vias metabólicas: Sua principal via de síntese ocorre pela glicólise, porém ele também é formado à partir da hidroxilação da acetona por um citocromo P450, pelo catabolismo da treonina ou da glicina, onde ambas são transformadas em aminoacetona, a qual pode sofrer oxidação aeróbica formando MGO (Beisswenger, et al., 2005; Dutra, et al. 2001). Na glicólise, o MGO é formado de maneira espontânea através da interconversão de trioses fosfato como fosfato de diidroxiacetona (DHAP) e o gliceraldeído-

3-fosfato (G3P). A disfunção da atividade da enzima triose fosfato isomerase, pode catalisar a formação de MGO (Kalapos, 1999). Particularmente, os níveis de MGO estão elevados em condições de hiperglicemia, disfunções metabólicas e deficiência da enzima triosefosfato isomerase (Orosz et al., 2009).

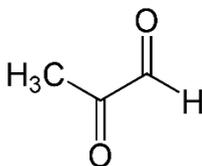


Figura 3. Estrutura química do metilglioxal.

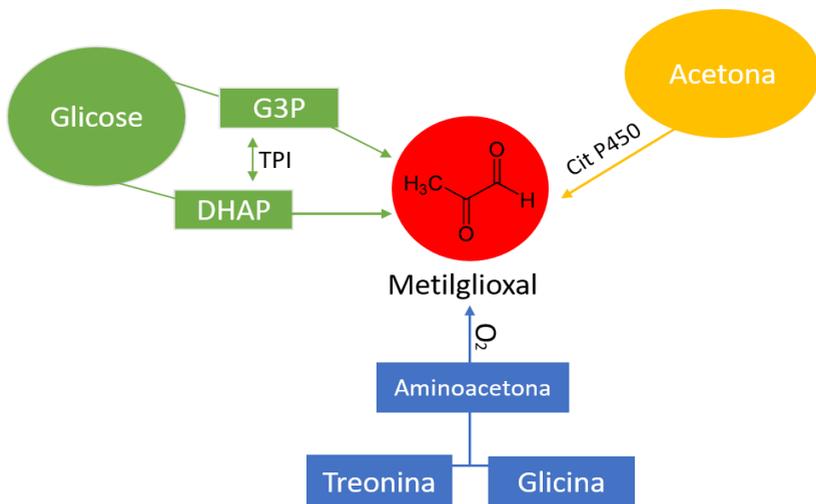


Figura 4. Rotas metabólicas para formação do metilglioxal. A principal via de formação do metilglioxal (MGO) é pela via glicolítica, através da conversão espontânea das trioses fosfatos gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e fosfato de diidroxiacetona (DHAP). A formação do MGO pode ser catalisada pela alterações na atividade da enzima triose fosfato isomerase (TPI). O MGO também pode ser formado pelo metabolismo de aminoácidos como a treonina e a glicina, que se transforma em aminoacetona, que por sua vez forma o metilglioxal por oxidação aeróbica. O processo de hidroxilação de acetonas pelas citocromos P450 também ocasionam na formação de MGO.

O MGO é um composto citotóxico devido sua capacidade de formar produtos finais de glicação avançada (AGEs - do inglês, *advanced glycation end products*) (Synold, et al. 2008). Os AGEs constituem grande variedade de substâncias formados a partir de interações amino carbonila, de natureza não-enzimática, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos (Monnier, 2003). O grupo carbonila do MGO especificamente pode reagir com grupamentos amino e sulfidril de aminoácidos como lisina, arginina e cisteína e assim forma diversos tipos de AGEs como a carboximetilisina e o metilglioxal 5-hidro-5-metilimidazolonas (MG-H1) (Ahmed et. al., 1986).

As AGEs ao ativarem seus receptores (RAGE) presentes em vários tipos celulares, desencadeiam uma serie de respostas associadas à diferentes fisiopatologias, como na Diabetes *mellitus* (Brownlee, 2001; Hambsch et al., 2010). É demonstrado também que quando os RAGEs são ativados, desencadeiam a formação de EROs e processo inflamatório (Yan et. al., 2009)

Para evitar os efeitos citotóxicos do MGO, os organismos possuem formas de detoxificação que podem ser enzimáticas ou não-enzimáticas. A principal via de detoxificação do MGO ocorre pelo ciclo das glioxalases, sendo dependente da presença de glutationa (GSH). O MGO e a GSH reagem espontaneamente formando hemitioacetal. Por sua vez, o hemitioacetal é transformado em S-D-lactoilglutationa pela ação da enzima glioxalase I com a utilização de uma GSH. O S-D-lactoilglutationa é então hidrolisado pela enzima glioxalase II em D-lactato. Neste último passo a GSH é regenerada e liberada em sua forma reduzida (Thomalley, 1996).

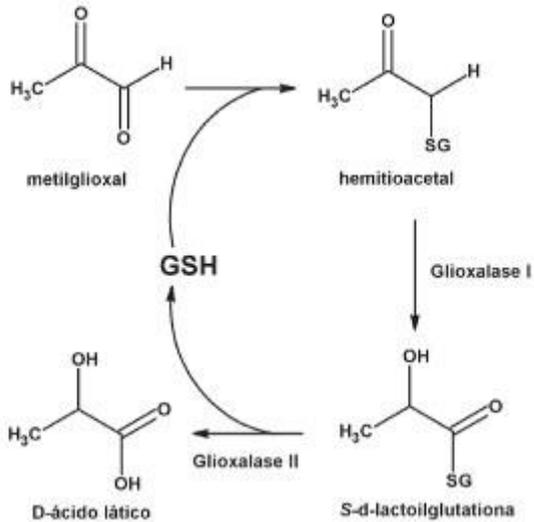


Figura 5. Mecanismo de detoxificação do metilglioxal pelo ciclo das glioxalases. O MGO reage com a glutatona (GSH) espontaneamente formando o hemitioacetal. O hemitioacetal é transformado em S-d-lactoilglutaciona pela enzima glioxalase-I. Por sua vez, a S-d-lactoilglutaciona é hidrolisada em D-ácido láctico pela glioxalase-II e a GSH é restabelecida neste último passo. Fonte: Scielo. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000032>

No exercício físico, alguns trabalhos relatam que os níveis de MGO poderiam estar aumentados no músculo esquelético devido à uma maior atividade metabólica de aminoácidos, formando aminoacetonas, que por sua vez, poderiam formar MGO (Haralambie e Mössinger 1980). Entretanto, como a detoxificação do MGO parece ser dependente de GSH, trabalhos como de Dieter e Vella (2013) relataram que o exercício físico de forma crônica e aguda, ao aumentarem a atividade do fator de transcrição NRF2 acaba induzindo a biossíntese de GSH. Desta forma, postularam que o exercício físico pode atenuar os efeitos do MGO através de uma maior biossíntese de GSH.

Autores tem relatado que o MGO e o ciclo das glioxalases estão envolvidos na modulação comportamental. Trabalhos demonstram que os níveis MGO no liquor de pacientes com a doença de Alzheimer (AZ – do inglês *Alzheimer disease*) estão até 2x mais alto do que indivíduos controles (Kuhla et al., 2005). De maneira bastante interessante, Distler et. al (2012) demonstraram que uma maior atividade da Glo1 induz a um

comportamento tipo-ansioso por diminuir a concentração de MGO. Também foi demonstrado que níveis elevados de MGO estão associados na indução de comportamento do tipo-antidepressivo e tipo-ansiolítico em modelos animais (Distler e Palmer, 2012; Hovatta et al., 2005; Jang et al., 2017).

1.5 Transtorno Depressivo Maior

O transtorno depressivo maior é um dos transtornos psiquiátricos mais prevalentes na população mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO – Do inglês *World Health Organization*), cerca de 322 milhões de pessoas (WHO, 2015), de todas as idades, sofrem de depressão. No Brasil, segundo o WHO (2015) o transtorno depressivo maior acometia aproximadamente 11 milhões de pessoas, algo em torno de 5,8% da população nacional. Além de sua alta prevalência e incidência na população mundial e brasileira é de se ressaltar também que esta doença apresenta prevalência gênero específica, acometendo cerca de um em cada seis homens e uma a cada quatro mulheres.

O diagnóstico do transtorno depressivo é realizado através de uma acurada anamnese com a análise dos relatos dos sintomas feitos pelo paciente e comumente utilizando o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5 (DSM-5). Os sintomas listados pelo DSM-5 do transtorno depressivo maior seguem a tabela abaixo:

Tabela 1. Sintomas do transtorno depressivo segundo o DSM-V

1) Humor deprimido
2) Anedonia
3) Perda ou ganho de peso
4) Insônia ou hipersônia
5) Agitação ou retardo motor
6) Fadiga ou perda de energia
7) Sentimentos de inutilidade ou de culpa excessiva
8) Capacidade diminuída para pensar ou se concentrar
9) Pensamentos recorrentes de morte ou ideia suicida e tentativa de suicídio

Para o diagnóstico da depressão, o paciente deve apresentar pelo menos 5 sintomas dos listados, sendo obrigatoriamente apresentar ao menos 1 dos 2 primeiros sintomas da tabela (American Psychiatric Association, 2013).

A etiologia da depressão ainda não está completamente elucidada, porém sabemos que existem alterações fisiológicas, bioquímica, genética e morfológicas envolvidas na patologia, o qual resulta em vários sintomas da doença. Essas alterações são bastante evidentes nos sistemas de neurotransmissores, principalmente nos sistemas serotoninérgicos, dopaminérgico e noradrenérgicos (Wong e Licinio, 2001). Particularmente, alguns estudos têm demonstrado por anos que uma diminuição de monoaminas, como serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina, na fenda sináptica está amplamente correlacionada com sintomas depressivos. Sendo assim, surgiu a hipótese monoaminérgica da depressão em que se postula que esta doença está associada a baixos níveis de monoaminas e/ou até mesmo de deficiência na atividade dos seus receptores.

Os fármacos antidepressivos agem aumentando a disponibilidade de monoaminas na fenda sináptica (Ordway et al., 1999; Rossi et al., 2004). Esse aumento se dá por bloqueio da recaptação das monoaminas ou por inibição da enzima monoamina oxidase (iMAO), enzima responsável pela degradação das monoaminas (Ordway et al., 1999). Outras ações de fármacos com efeito antidepressivo, tem como objetivo antagonizar ou ligar-se como um agonista nos receptores para tais aminas biogênicas (Jenck et al., 1994; Lucki, 1991; Celada et al., 2004). Além disso, estudos pré-clínicos demonstraram que a modulação da sensibilidade de receptores monoaminérgicos é um alvo terapêutico para a ação de diversos antidepressivos, como os inibidores da recaptação de serotonina (ISRS), inibidores da recaptação de noradrenalina (ISRN), tricíclicos, atípicos, inibidores da enzima monoamina oxidase (iMAO) e terapia eletroconvulsiva (Charney et al., 1981).

Os mecanismos monoaminérgicos possuem algumas limitações para explicar a fisiopatologia da depressão. Por exemplo, nem toda droga que aumenta os níveis de monoaminas na fenda sináptica, tem efeito antidepressivo, por exemplo a cocaína ou anfetamina (Stahl, 1994; Stahl, 1998). Outro fator a ser questionado é que os antidepressivos aumentam os níveis de monoaminas na fenda sináptica de forma rápida, porém os efeitos clínicos levam em torno de 3 a 4 semanas após o início do tratamento (Torres et al., 2003; Rosenblat et al., 2015). Desta maneira, outras hipóteses surgem para tentar explicar os mecanismos fisiopatológicos do transtorno depressivo, como a hipótese neurotrófica (Duman e Monteggia, 2006). Nesta hipótese, postula-se que uma disfunção na neuroplasticidade, em específico nos níveis de proteínas que geram trofismo neuronal estaria associado ao transtorno depressivo maior. O BDNF é uma das principais neurotrofinas responsáveis pela plasticidade neural regendo o crescimento, sobrevivência e maturação de novos neurônios e regulando assim o humor

e a memória/aprendizagem (Yamada et al., 2002; Papp et al., 2017). Uma redução de BDNF no sangue e nas estruturas encefálicas como o córtex pré-frontal e hipocampo está sendo amplamente demonstrada em indivíduos depressivos e/ou suicidas (Karege et al., 2005).

1.6 Exercício Físico e Transtorno Depressivo

Os efeitos antidepressivo do exercício físico são bastante relatados pelo banco de dados do PubMed, constando 834 publicações com as palavras-chave “*exercise*” e “*depression*” no título, sendo a publicação mais antiga de 1905 (Franz e Hamilton, 1905). De lá para cá o exercício físico vem sendo bastante estudado como uma alternativa na prevenção e tratamento do transtorno depressivo, embora seus mecanismos de ação como antidepressivo ainda não tivessem sido até então acenados. Para tentar elucidar os mecanismos biológicos por de trás dos efeitos benéficos do exercício físico no SNC alguns estudos utilizando animais começaram a demonstrar os efeitos do exercício físico na modulação dos níveis de neurotrofinas em estruturas encefálicas, bem como em uma melhora na neurogênese hipocampal adulta. No início dos anos 2000, pesquisadores demonstraram pela primeira vez o efeito antidepressivo da livre exposição de ratos à atividade física na roda de corrida voluntária e um putativo mecanismo de ação dependente de um aumento do RNAm de BDNF no hipocampo cerebral (Adlard e Cotman, 2004). Subsequentemente, alguns trabalhos clínicos reforçaram que as melhoras no humor induzidas pelo exercício físico ocorrem através da síntese de neurotrofinas em estruturas encefálicas do sistema límbico (Erickson et al., 2011; Lawson et al., 2014; Musemeci et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que o exercício físico aumenta a expressão de diversas outras neurotrofinas como o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), neurotrofina-3 (NT3), fator de crescimento de fibroblasto (FGF-2), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento nervoso (NGF) (Cotman et al., 2007; Russo-Neustadt et al., 1992).

1.7 Irisina e o eixo músculo-encéfalo

A busca pela compreensão dos mecanismos biológicos que envolvem as melhoras clínicas de doenças que acometem o SNC induzidas pelo exercício físico é incessante. Dentre as moléculas atribuídas a estas melhoras, está a Irisina. Essa molécula foi primeiramente descrita em células musculoesquelética de ratos em 2012 por Bostrom e colaboradores

(2012) na Universidade de Harvard. Estudos posteriores demonstraram que a Irisina é um peptídeo de função e estrutura homóloga entre os mamíferos, sendo totalmente similar entre humanos e ratos (Aydin S., 2014). Sua produção acontece em diferentes tecidos, como no tecido ósseo e no tecido adiposo, porém sua maior produção ocorre nos músculos esqueléticos. Esse peptídeo pode ter ações autócrinas, parácrinas e endócrina em tecidos longínquos (Pedersen e Febbraio 2012). Devido a estes fatores, esse peptídeo vem sendo amplamente classificado como uma miocina (Moreno-Navarret et al., 2013).

Nos músculos esqueléticos, sua produção ocorre em maior escala a partir de estímulos proveniente do exercício físico. Estes estímulos aumentam a transcrição e fosforilação (ativação) do coativador-1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 α) que ao se conjugar com o fator de transcrição ERR α coordena a transcrição do domínio da proteína transmembrana fibronectina tipo III contendo o domínio 5 (FNDC5) (Bostrom et al., 2012 ; Goto et al., 2000 ; Pilegaard et al. 2003). Na porção transmembrana, o FNDC5 sofre uma clivagem, liberando assim um peptídeo que será glicosilado e assim a Irisina é sintetizada e liberada na corrente sanguínea, onde ela assim torna-se um mensageiro celular e gera uma intercomunicação entre tecidos celulares (Bostrom et al., 2012; Schumacher et al., 2013; Wrann et al., 2013).

É demonstrado que a ação do coativador PGC1- α na regulação da expressão de FNDC5/Irisina ocasiona expressão de moléculas que aumentam a biogênese mitocondrial, como a proteína desacopladora 1 (UCP-1). A UCP-1 é uma proteína desacopladora termogênica, responsável por impedir a força próton motriz necessária ao acoplamento da transferência de elétrons a síntese de ATP e assim produz calor. O processo de biogênese mitocondrial no tecido adiposo branco (TAB), converte o mesmo em tecido adiposo marrom (TAM), este processo é conhecido como “*browning*” (Wu et al., 2012). Desta maneira, a Irisina pode atuar aumentando o gasto energético, e promovendo a perda de peso através do metabolismo dos ácidos graxos, o qual fornece acetil-coa para produção de ATP (Bostrom et al. 2012).

Para avaliar os níveis de Irisina em humanos, estudos recentes têm demonstrado que jovens obesos após uma sessão de exercício físico aeróbico tiveram os níveis de Irisina plasmática aumentado. Porém, os jovens obesos que passaram por um treino de exercício contra-resistido não tiveram mudanças nos níveis de irisina plasmática (Blizzard LeBlanc et. al, 2017). Jedrychowski et al., (2015) desenvolveram um ensaio para quantificar os níveis da Irisina na circulação humana, neste trabalho, o grupo demonstrou que os níveis de Irisina no plasma estão aumentados em

indivíduos que passaram por um treino aeróbico em relação a indivíduos sedentários.

Além da síntese de FNDC5/Irisina no músculo esquelético, ela também pode ser sintetizada no próprio SNC, e assim trabalhos vem buscando os efeitos comportamentais da Irisina. Siteneski et al. (2017), por exemplo, ao analisar os efeitos da administração central da Irisina em camundongos, observaram uma ação antidepressiva da Irisina. No mesmo trabalho, demonstraram que a Irisina administrada regula os níveis de PGC1- α , FNDC5 e BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal. Papp e companheiros (2017) postularam que o humor deprimido em pacientes com Doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), pode ocorrer devido suas limitações para atividades físicas, e conseqüentemente influenciando o eixo Irisina-BDNF. Neste trabalho, observaram baixos níveis de Irisina e BDNF sérica nos pacientes com humor deprimido. Uma publicação de Wang e Pan (2016), demonstrou que os níveis de Irisina eram diminuídos no córtex pré-frontal e no líquido cefalorraquidiano (LCR) em ratos submetidos a um protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI). Os déficits comportamentais nos animais que passaram pelo protocolo foram revertidos pela injeção de Irisina. Ainda neste trabalho, Wang e Pan demonstraram que a ação antidepressiva da Irisina no ECI, pode se dar pela regulação do metabolismo energético no córtex pré-frontal, o qual foi afetada pelo ECI.

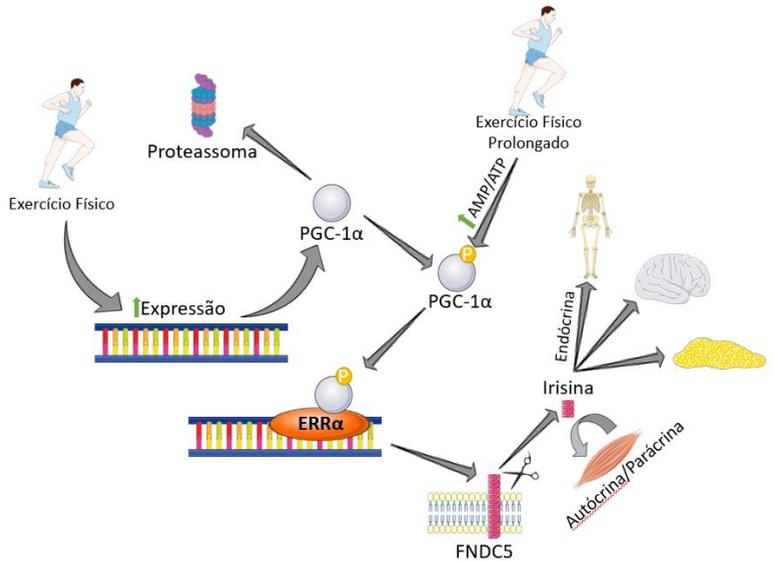


Figura 6. Síntese da Irisina. O exercício físico estimula a produção coativador-1 α do receptor γ ativado por proliferador de peroxisoma (PGC-1 α). O PGC-1 α então pode ser ativado através de estímulos prolongados de exercício físico, pela hidrólise de ATP formando AMPK que fosforilará o PGC-1 α , o translocando para o núcleo onde irá se conjugar com o fator de transcrição ERR α e irá induzir a expressão da fibronectina tipo III contendo 5 (FNDC5). Por fim, o FNDC-5 sofre clivagem na sua porção extramembranar, liberando a Irisina na corrente sanguínea, que por sua vez, pode ter ação autócrina, parácrina ou endócrina. Fonte: do autor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do protocolo de exercício físico aeróbico de *endurance* no comportamento, neuroplasticidade e sistema redox de camundongos *Swiss*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comportamento do tipo-depressivo, tipo anedônico e tipo-ansioso em camundongos submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbico de *endurance*;
- Avaliar o efeito do exercício físico sobre a modulação redox no córtex pré-frontal e hipocampo;
- Mensurar os níveis de monoaminas no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado de camundongos submetidos ao nosso protocolo de exercício físico.
- Investigar os efeitos do exercício físico sobre o imunoconteúdo de FNDC5 no músculo gastrocnêmio, músculo quadríceps, no hipocampo e no córtex pré-frontal

3 JUSTIFICATIVA

O transtorno depressivo maior é um transtorno psiquiátrico bastante prevalente na população mundial acometendo cerca de 322 milhões de pessoas (WHO, 2015). É uma patologia que afeta a qualidade de vida do indivíduo, gerando uma redução no rendimento técnico-profissional, bem como um comprometimento nas relações afetivas e sociais do paciente. O transtorno depressivo no seu estado mais grave pode levar a pessoa ao suicídio (WHO, 2015). Por ser uma doença multifatorial, os mecanismos biológicos que envolvem esta neuropatologia ainda são pouco elucidados. Entretanto, diversos trabalhos demonstram que o dano oxidativo, disfunção nos níveis de monoaminas e nos níveis de neurotrofinas, estão ligadas a comportamentos depressivo (Russo-Neustadt et al. 2001; (Davies et al., 1982; Neary et al., 1992; Cotman et al., 2007).

Por ser bem validado que o exercício físico é associado a qualidade de vida e saúde, muitos estudos reportam seus efeitos no humor e em transtornos psiquiátricos. Neste sentido, seus efeitos clínicos na depressão são bem documentados (Perraton et al., 2010). Entretanto, os mecanismos envolvidos na ação antidepressiva do exercício físico possuem bastante lacunas. Buscamos desta maneira um melhor conhecimento das modulações biológicas do eixo músculo esquelético-encéfalo através do exercício físico, visto que assim pode abrir um leque de futuros alvos terapêuticos para o tratamento do transtorno depressivo.

4 METODOLOGIA

Foram utilizados camundongos *Mus musculus* fêmeas da linhagem *Swiss*, devido a facilidade de trabalhar com fêmeas desta linhagem, sendo o sexo feminino menos propenso a agressividade e a formação de animal alfa. Os animais ficaram no biotério setorial da bioquímica com acesso livre a água e comida, com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, mantidos a temperatura média de 22-25°C. O protocolo experimental de exercício físico foi realizado no período da tarde e iniciado com animais de 2 meses de idade, sendo submetidos ao exercício físico aeróbico na esteira por 2 meses, enquanto os animais sedentários permaneceram em suas caixas sem acesso a comida e água. Após a última sessão de exercício físico, os animais foram ambientados na sala de análises comportamentais do departamento de bioquímica. 24 horas após a última sessão de treinamento os animais foram pesados e realizaram os testes comportamentais na sala de análises comportamentais da bioquímica, com iluminação entre 70 e 75 lux, no horário das 12 às 19 horas. Os testes ocorreram em ordem de menos aversivo para o mais aversivo seguindo: Teste do campo aberto (TCA), Teste da preferência pela sacarose (TPS), Teste de borrifagem de sacarose (TBS), Teste Suspensão pela cauda (TSC) e Teste do nado forçado (TNF). Também foi realizado o Teste de força de agarre (TFA). Os camundongos foram submetidos à eutanásia por decapitação imediatamente após os testes comportamentais. Em um conjunto de experimentos independentes e de forma similar ao tratamento anteriormente apresentado os animais foram sacrificados por decapitação 24 horas após a última sessão de treinamento e as estruturas musculares dos membros posteriores: gastrocnêmio e quadríceps; e cerebrais hipocampo, estriado e córtex cerebral foram pesados e coletados para análises bioquímicas. É válido ressaltar que este projeto apresenta aprovação do comitê de ética com uso de animais da UFSC (6074241016) e teve todos os cuidados necessários para minimizar o sofrimento e desconforto dos animais.

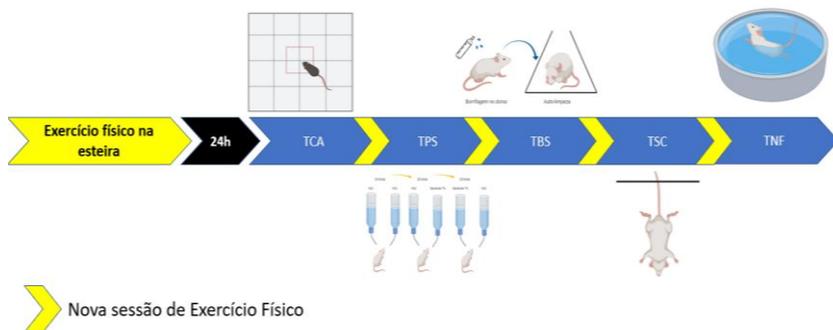


Figura 7. Organograma do protocolo experimental.

4.1 Protocolo Experimental de Exercício Físico Aeróbico de *Endurance* na Esteira

Os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento físico aeróbico de *endurance* em relação ao grupo controle (sedentários). Os animais do grupo exercitado foram expostos a um treinamento físico na esteira de corrida (5x/semana, com uma carga crescente de intensidade por um período de 45 minutos) por 60 dias, durante o período da tarde. A intensidade inicial foi de 6 m/min na primeira semana e a cada semana foi acrescido 2 m/min na velocidade da esteira. Os animais foram então submetidos aos testes comportamentais 24 horas após pararem de correr na esteira. Este protocolo de exercício físico aeróbico em camundongos foi padronizado previamente através de experimentos pilotos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa. A taxa de desistência dos animais no protocolo de exercício físico varia entre 10-20%.

4.2 Testes Comportamentais

4.2.1 Teste do campo aberto (TCA)

O TCA é utilizado como uma ferramenta importante nas pesquisas comportamentais (Schmitt e Hiemke, 1998). Também é utilizado para avaliar atividade locomotora e ser uma ferramenta complementar do TNF e TSC para evitar falsos-positivos de tratamentos que possam causar hiperlocomção (Rodrigues et al., 2002). O aparato consiste em uma caixa de madeira (40 x 60 x 50 cm) dividida em 12 quadrantes de mesmo tamanho. A locomoção dos animais foi mensurada pelo número de

quadrantes cruzados com as quatro patas e o número de levantamentos dos animais para também analisar o comportamento de exploração. Além disso, o número de comportamentos estereotipados de auto-limpeza e o número de bolos fecais, bem como o tempo no centro e o tempo na periferia dos animais, foram mensurados como putativo indicativo de comportamento do tipo - ansioso/ansiolítico.

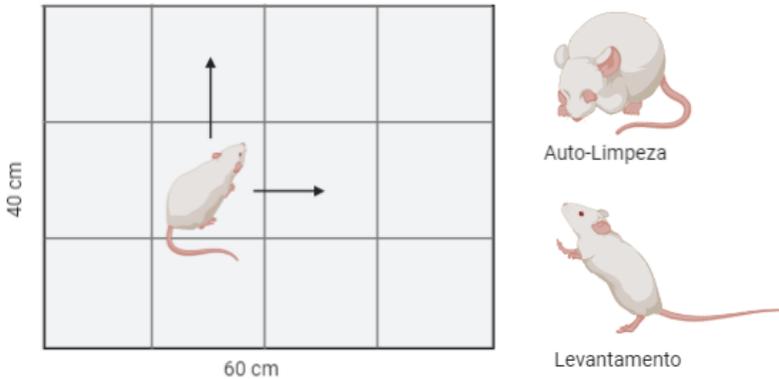


Figura 8. Teste do Campo Aberto. Fonte: Produzida pelo autor no website: Biorender.com

4.2.2 Teste do nado forçado (TNF)

O TNF foi usado para avaliar os possíveis efeitos do tipo-antidepressivo do exercício físico aeróbico de *endurance*. Ele consiste na observação comportamental dos animais submetidos a uma situação de desespero comportamental inescapável (Porsolt et al., 1977). A duração do teste foi realizada por seis minutos (sessão única) em um cilindro plástico. Ao fim do teste, foi mensurado o tempo de imobilidade dos animais, sendo que antidepressivos clássicos, como a fluoxetina, diminuem o tempo de imobilidade (Cunha et al., 2008).



Figura 9. Teste do nado forçado. Fonte: Biorender.com

4.2.3 Teste da suspensão pela cauda (TSC)

O TSC foi utilizado para avaliar os possíveis efeitos do tipo-antidepressivo do exercício físico aeróbico de *endurance*. O teste é baseado no fato que animais que são submetidos a curtos períodos de estresse inescapável pela suspensão de sua cauda. O tempo total do teste foi de 6 min, e a duração da imobilidade foi mensurada apenas quando o animal permanecesse completamente imóvel (Steru et al., 1985). Assim como o TNF, antidepressivos clássicos diminuem o tempo de imobilidade dos animais no TSC.

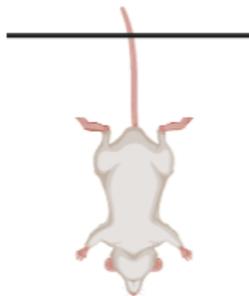


Figura 10. Teste suspensão pela cauda. Fonte: Produzida pelo autor no websiste: Biorender.com

4.2.4 Teste de borrifagem de sacarose (TBS)

O TBS é utilizado para avaliar comportamento anedônico (diminuição do prazer/interesse por atividades), em modelos animais que induzem o comportamento do tipo-depressivo é observado um aumento da anedonia (Willner, 1987). Foi borrifada uma solução de sacarose 10% no dorso do animal duas vezes então o animal foi alocado num aparato de vidro cilíndrico onde avaliamos a latência para iniciar o comportamento de auto-limpeza e o tempo total de auto-limpeza do animal durante 5 minutos. Em modelos animais de depressão o comportamento de autolimpeza nesse teste é diminuído.

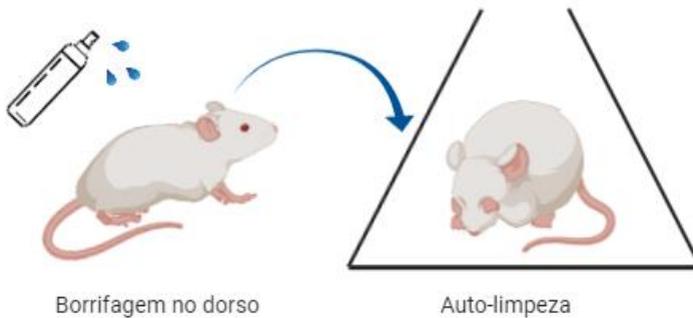


Figura 11. Teste de borrifagem de sacarose. Fonte: Produzida pelo autor no website: Biorender.com

4.2.5 Teste de preferência pela sacarose (TPS)

Assim como o teste de borrifagem de sacarose, o TPS foi utilizado para avaliar um comportamento anedônico nos animais (Willner, 2005). Os animais foram isolados em caixas por um período de 48 horas. Foram então disponibilizadas 2 garrafas com água por mais 24h. Após este período, foram duas novas garrafas foram colocadas para os animais (uma com água e outra com sacarose 1%.) por um novo período de 24h. Ao fim deste período as garrafas foram invertidas de posição e os animais ficaram por um período de mais 24 horas. Ao fim do teste foi mensurado o consumo de água e de sacarose, e assim foi estabelecido a taxa de preferência de sacarose dos animais pela razão entre o consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e o consumo total (consumo de água (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de água) + consumo de sacarose (peso inicial menos o peso final em gramas das garrafas de sacarose) e multiplicando o resultado por 100.

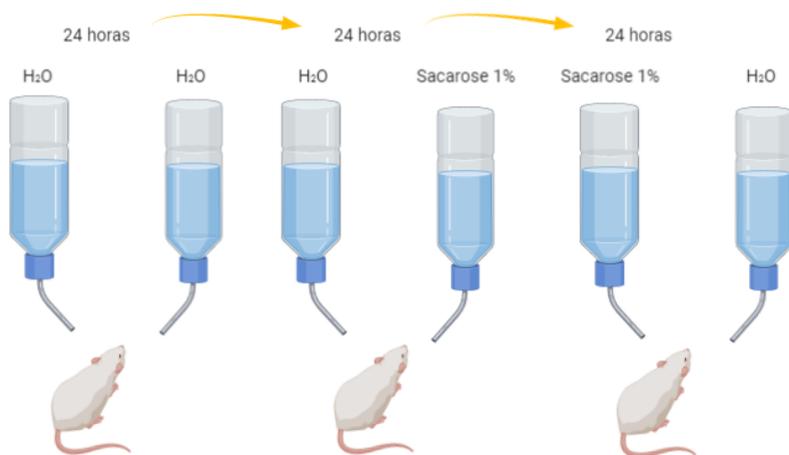


Figura 12. Teste de preferência pela sacarose. Fonte: produzida pelo autor no website: Biorender.com

4.2.6 Teste de Força de agarre (TFA)

Realizamos o Teste de força de agarre (TFA) para avaliar a força máxima de agarre exercida (Fowler et al., 2002; Prado et al., 2006). O aparelho para o teste consiste em um suporte conectada a um transdutor de força. O aparelho foi calibrado com pesos de 5, 10, 20, 50, 100 e 200g. Os animais foram condicionados a sala de experimento 24h antes do experimento. Durante o experimento, os animais eram induzidos a se agarrar no suporte metálico com uma das patas traseiras. Os animais então eram puxados pelo experimentador com força progressiva até se soltarem da haste. Foi registrado o pico de força máxima quando o animal se soltou da haste, expresso em grama (g). A força da pata foi registrada ao longo do protocolo de exercício pela razão da força da pata (g) pelo peso corpóreo (g) do animal.

4.3 Análises Bioquímicas

4.3.1 Análise da atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi avaliada pelo método descrito por (Wendel, 1981), a reação se inicia pela adição de peróxido de cumeno (1 mM). A

enzima GPx presente na amostra degrada o peróxido a partir da utilização da GSH como doador de elétrons, resultando em álcool, GSSG e água. A GSSG é rapidamente reduzida pela GR através do uso de NADPH, que pode ser medido espectrofotometricamente em 340 nm. A atividade da GPx é proporcional ao consumo de NADPH.

4.3.2 Análise da atividade da enzima Glutationa redutase (GR)

A atividade da GR foi mensurada pelo método de Carlberg e Mannervik (1985). A GR presente na amostra reduz GSSG à GSH, consumindo para isso NADPH. Esse consumo de NADPH pode ser quantificado, a partir da leitura em filtro de 340 nm em espectrofotômetro

4.3.3 Mensuração da atividade da enzima tioredoxina redutase (TrxR)

A TrxR catalisa a redução de DTNB consumindo NADPH, cuja o consumo foi utilizado para estimar a atividade TrxR. Os tecidos homogeneizados foram mantidas em tampão fosfato (0,1 M, EDTA 1 mM, pH 7,4), as amostras foram centrifugadas (15 min, 15000 g) e uma alíquota foi incubada com DTNB durante 15 min (temperatura ambiente) para permitir a reação com os tióis presentes na amostra. Posteriormente, o NADPH foi adicionado para iniciar a reação durante 5 min e subsequente foram realizadas leituras a 340 nm.

4.3.4 Mensuração da atividade da Catalase (CAT):

A atividade da catalase foi determinada pela queda do consumo de H_2O_2 na absorbância (240nm). A atividade é mensurada no momento em que é adicionado o H_2O_2 (30 mM), conforme previamente descrito por Aebi (1984)

4.3.5 Mensuração da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método descrito por Misra e Fridovich (1972). Foram adicionados 5, 10 ou 20 μ L de amostra a uma solução contendo epinefrina. A presença de SOD inibe a auto-oxidação da epinefrina. A taxa de inibição foi monitorada por 180 segundos. A quantidade de SOD necessária para produzir 50% de inibição foi definida como uma unidade de SOD. Os resultados foram expressos como unidades de SOD/ mg de proteína.

4.3.6 Análise da atividade da Glicoxalase I (glo-I)

Mensuramos a atividade glicoxalase I a partir da formação de S-D-lactoilglutaciona (Allen e Thornalley, 1993). Incubamos GSH 100 mM e MGO 100 mM em tampão fosfato 50 mM, pH 6.6, a 37° C por 10 min. Utilizamos uma alíquota desta solução ao mesmo tampão formando um meio de reação contendo 2 mM de GSH e MGO. Adicionamos a amostra nesta solução e fizemos a leitura da absorbância durante 1-5 min, em 240 nm. A atividade da Glo-I foi mensurada pela formação de S-D-lactoilglutaciona. Os valores foram expressos como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

4.3.7 Mensuração dos níveis de serotonina, noradrenalina, e dopamina no estriado, hipocampo e córtex cerebral:

A determinação dos níveis de monoaminas (serotonina, noradrenalina e dopamina) foi conduzido como descrito por De Benedetto et al. (2014). O córtex cerebral foi dissecado em gelo, pesado e homogeneizado em uma solução contendo 0,2 M de ácido perclórico e 3 mM de cisteína 1:3 (peso:volume). O homogeneizado foi centrifugado (12000 g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante resultante foi congelado a -80°C para análise por cromatografia líquida de alta performance com detecção de fluorescência (HPLC-FD do inglês - *High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection*). Uma curva padrão foi realizada com concentrações de 0,016-2,50 ng/ μl para DA, 0,031-2,50 ng/ μl para 5-HT, 0,025-2,00 ng/ μl para NE. A fluorescência foi mensurada em 279/320 nm (excitação/ emissão). A altura e a área do pico foram quantificadas usando Jasco PU-2080 plus analytical HPLC e normalizada por mg de tecido.

4.3.8 Detecção dos níveis de proteínas por Western Blotting e Dot Blotting

Ao término do protocolo de exercício, foram coletados dos animais exercitados e sedentários os músculos gastrocnêmio e quadríceps e as estruturas encefálicas córtex pré-frontal, estriado e hipocampo. As amostras foram dissecadas em uma temperatura de 4° C e armazenadas em a -80° C.

As amostras foram homogeneizadas mecanicamente com tampão de lise numa proporção 1:10 (9 volumes de tampão + peso médio) e centrifugados por 20 min a 20000g por 4min. O sobrenadante foi colocado

em um novo microtubo onde foi adicionado 20% de sample buffer 5x + 5% de beta-mercaptoetanol. As amostras foram sonicadas (5 a 10 seg), fervidas por 5min a 95° C e centrifugadas por 1min a 15000 rpm.

Tabela 2. Solução tampão de lise

Solução	Volumes	Concentração Final
Tris 100mM/EDTA 2mM/NAF 200mM	2ml	Tris 50mM/EDTA 1mM/NAF 100mM
Coquetel inibidor proteases (SIGMA)	500µl	-
PMSF(100mM)	4 µl	PMSF - 0,1mM
Na₃VO₄ (200mM)	40 µl	Na ₃ VO ₄ - 2mM
Triton x100	40 µl	Triton 1%
Glicerol 50%	800 µl	Glicerol 10%
H₂O q.s.p	616 µl	-
Total	4ml	-

*NAF = Fluoreto de Sódio

Na₃VO₄ = Ortovanadato de Sódio

Os níveis de Irisina foram observados através da técnica de Western-blotting, cujo protocolo foi padronizado em nosso laboratório. A porcentagem do gel utilizado foi de 15%, devido tamanho da Irisina. Para eletroforese foi pipetado em cada poço 15µl de amostra, além de 2µl do padrão de peso molecular e 15µl do padrão da Irisina. A eletroforese foi realizada por 1h e 35min, com voltagem de 140 V e corrente de aproximadamente 50mA. Após a eletroforese, utilizamos membranas de nitrocelulose para eletrotransferência. Na eletrotransferência foi montado o sistema de transferência com o uso de uma cuba específica, todo o sistema ficou imerso em tampão de transferência (western blot buffer 1x) e a cuba dentro de uma caixa imersa em gelo sobre um agitador magnético ligado. Na eletrotransferência o aparato foi configurado para operar com corrente constante de 100V, corrida de aproximadamente 500mA por 60min. Para o bloqueio da membrana, a membrana foi incubada por 1h sob agitação com 5% de leite desnatado em TBS. O anticorpo primário da Irisina/FNDC5 foi incubado overnight. No dia seguinte, o anticorpo primário foi recolhido, a membrana foi lavada com TBS-T por 5min, e o anticorpo secundário (10 ml de TBS-t e 2% de albumina) foi incubado por 1h. A revelação foi feita através do fotodocumentador ChemiDoc MP realizado no Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (Lameb) da UFSC.

Tabela 3. Gel 15% para corrida

15 % Gels	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels	unidade
Agua	4.1	8.3	12.4	16.5	ml
Acrilamida (40% 37.5:1)	3.8	7.5	11.3	15.0	ml
2M Tris Hcl pH 8.8	2	4	6	8	ml
20% SDS	50	100	150	200	μ l
APS 10%	50	100	150	200	μ l
TEMED	15	30	45	60	μ l
Total	10	20	30	40	ml

Stack	2 gels	4 gels	6 gels	8 gels	unidade
Agua	3.2	6.4	9.6	12.8	ml
Acrilamida (40% 37.5:1)	0.5	1.0	1.5	2.0	ml
0.5 M Tris Hcl pH 6.8	1.3	2.5	3.8	5.0	ml
20% SDS	25	50	75	100	μ l
APS 10%	25	50	75	100	μ l
TEMED	8	16	24	32	μ l
Total	5	10	15	20	ml

Os níveis de Malonaldeído, 4-HNE e MGO, foram feitos através da técnica de Dot blot. Os tecidos homogeneizados foram (3 μ g de proteína) transferidos para membranas de PVDF. Os imunocorredores de MDA foram detectados utilizando o anticorpo primário específico: anti-MDA (Abcam), anti-4-HNE, anti-MGO. Posteriormente as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (IgG) unido a peroxidase (Dafré et al., 2017). Para a obtenção de cargas de proteínas por poços nas membranas, as mesmas foram coradas com Ponceau S. As bandas de proteínas foram visualizadas por reação de quimioluminescência. A intensidade das bandas foi analisada por densitometria ótica no programa ImagemLab 4.1. (BioRad, USA).

4.4 Análise estatística

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados no software Graphpad Prism 8. Os dados obtidos foram avaliados por Teste t não paramétrico seguido pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média + erro padrão da média (E.P.M.).

5 RESULTADOS

5.1 Efeitos do Exercício Físico nos Aspectos Físicos dos Animais

Inicialmente avaliamos os efeitos do nosso protocolo de exercício físico aeróbico de *endurance* na manutenção do peso corporal dos animais. Assim foi demonstrado na figura 13A que a partir da sexta semana, os animais exercitados ganharam menos peso até o fim do nosso protocolo experimental. Na figura 13B demonstramos que os animais treinados tiveram um menor ganho de peso corporal em relação aos animais sedentários ($P < 0,05$) na oitava semana. Porém observamos que não houve alterações no peso das estruturas encefálicas (córtex pré-frontal e hipocampo), dos tecidos musculares (gastrocnêmio e quadríceps) e da glândula adrenal, conforme a tabela 4.

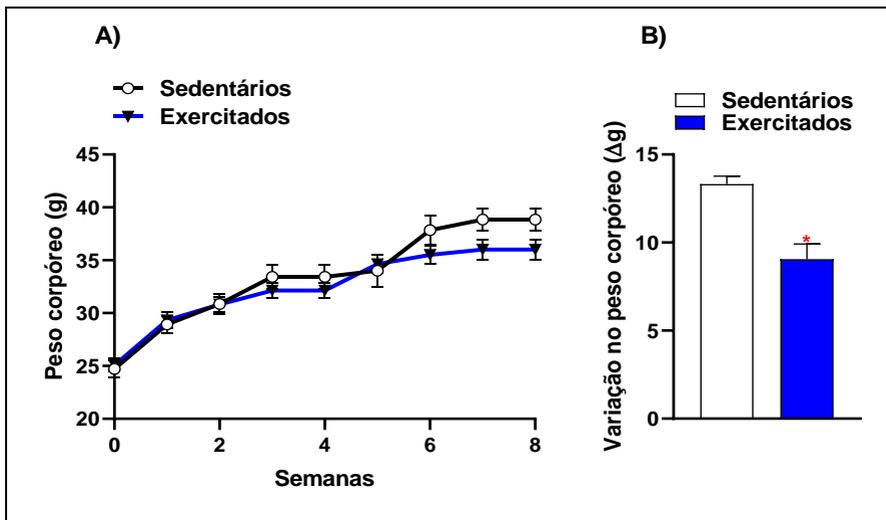


Figura 13. Exercício físico aeróbico reduz o aumento de peso corporal de camundongos Swiss. A) Variação de peso corporal ao longo de 8 semanas. B) Variação de peso corporal em relação ao início da intervenção. $n = 6-15$.

Conforme a figura 14 observamos através do teste de apreensão pelas patas que o nosso protocolo não alterou a força nas patas traseiras direita (Figura 14A) e esquerda (Figura 14B) dos animais no decorrer das 8 semanas de exercício.

Tabela 04. Pesos relativo dos tecidos corporais dos animais sedentários ou submetidos ao protocolo experimental de exercício físico aeróbico.

Grupo	Hipocampo (mg)/ Peso Corpóreo (g)	Córtex Pré- frontal (mg)/ Peso Corpóreo (g)	Adrenal (mg)/ Peso Corpóreo (g)	Gastrocnêmio (mg)/ Peso Corpóreo (g)	Quadriceps (mg)/ Peso Corpóreo (g)
Sedentários	1,680068 ± 0,100453	1,484366 ± 0,148435	0,1155 ± 0,006108	4,812035 ± 0,28592	5,569507 ± 0,282329
Exercitados	1,993465 ± 0,105105	1,514072 ± 0,190461	0,115 ± 0,004752	4,974686 ± 0,235951	5,221019 ± 0,278565

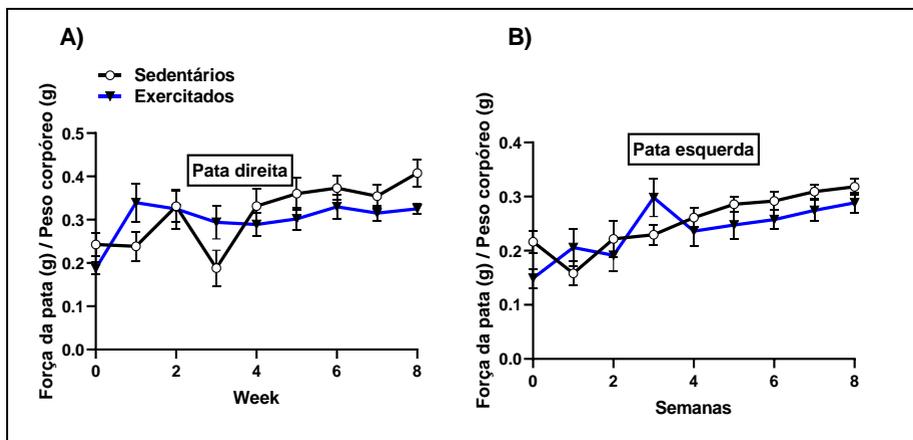


Figura 14. Exercício físico aeróbico não altera a força dos animais. Avaliação da força das patas traseiras direita (Painel A) e esquerda (Painel B) no teste apreensão das patas. n = 6-15.

5.2 Efeitos do Exercício Físico no Campo Aberto

Buscamos com o Teste do Campo Aberto avaliar os efeitos do nosso protocolo de exercício físico nos aspectos locomotores, exploratório e comportamentais (Schmitt e Hiemke, 1988). Conforme a demonstrado na Figura 15, o exercício físico não alterou os seguintes parâmetros avaliados: número de levantamentos (Figura 15B) e bolos fecais (Figura 15E). Também não teve efeito na quantidade de cruzamentos (Figura 15A). Entretanto, os animais exercitados obtiveram menor tempo de latência para sair do primeiro quadrante (Figura 15C), maior tempo no centro do aparato

e maior número de auto-limpeza (Figura 15D) no teste do campo aberto, em relação aos animais sedentários ($P < 0,05$) (Figura 15F).

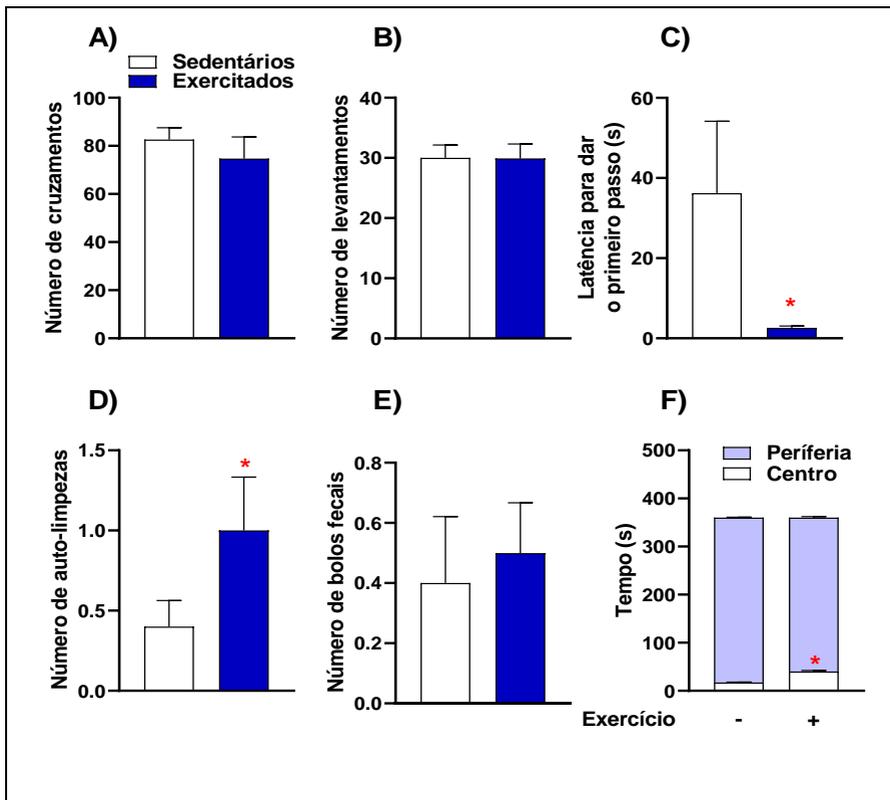


Figura 15. Exercício físico aeróbico não altera a ambulação, mas produz efeito ansiolítico em camundongos *Swiss*. Camundongos submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbico ou sedentários foram expostos ao teste do campo aberto e os seguintes parâmetros foram observados: **A)** Número de cruzamentos **B)** Número de levantamentos. **C)** Latência para realizar o primeiro passo. **D)** Número de auto-limpeza. **E)** Número de bolos fecais. **F)** Tempo no centro e na periferia do aparato. $n = 6-15$.

5.3 Efeitos do Exercício Físico no Comportamento do tipo-Depressivo e Anedônico

Após terminarem o protocolo de exercício físico, 24h depois, os animais passaram pelo TNF e TSC visando mensurar comportamentos associados a emocionalidade (Steru, 1985; Porsolt et al., 1977). Foi então

observado que o exercício físico aumentou o tempo de latência para imobilidade nos testes TSC e TNF ($P < 0,05$) (Figura 16A e 16B, respectivamente), nestes mesmos testes o protocolo de exercício físico foi hábil em reduzir o tempo de imobilidade dos animais ($P < 0,05$) (Figura 16E e 16F).

No TBS os animais não tiveram diferença no tempo de latência para auto-limpeza (Figura 16C) e no tempo de auto-limpeza (Figura 16G). No TPS (Figura 16D) não houve diferença no consumo de sacarose e água.

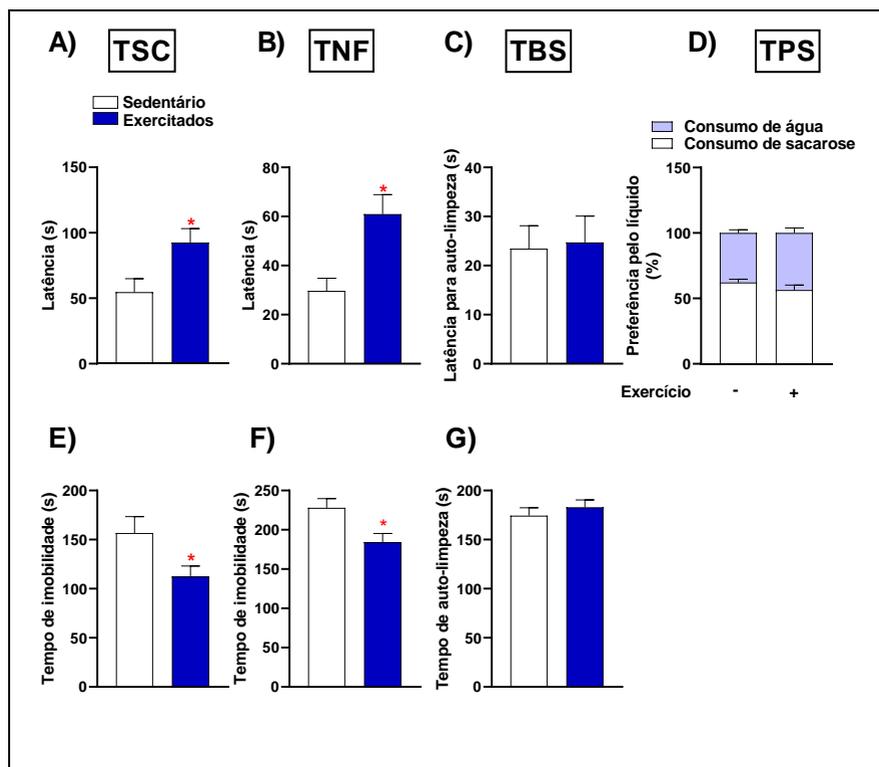


Figura 16. Exercício físico aeróbico produz efeito tipo-antidepressivo em camundongos Swiss. Camundongos submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbico ou sedentários foram expostos ao teste de suspensão pela cauda (Painéis A e E), teste do nado forçado (Painéis B e F), teste da borrifagem de sacarose (Painéis C e G), teste da preferência por sacarose (Painel D). $n = 6-15$.

5.4 Efeitos do Exercício Físico no Sistema de Enzimas Antioxidante nas estruturas encefálicas

Conforme é validado na literatura que o exercício físico pode modular a atividade Redox das células (Davies et al., 1982; Neary et al., 1992; Schneider e Irigaray, 2008). Buscamos então, avaliar os efeitos do nosso protocolo de exercício físico aeróbico de *endurance* nas atividades de enzimas que atuam nos processos de manutenção Redox das estruturas encefálicas dos camundongos. Avaliamos então, que o nosso protocolo de exercício físico não alterou a atividade destas enzimas no córtex pré-frontal e no hipocampo (Figura 17).

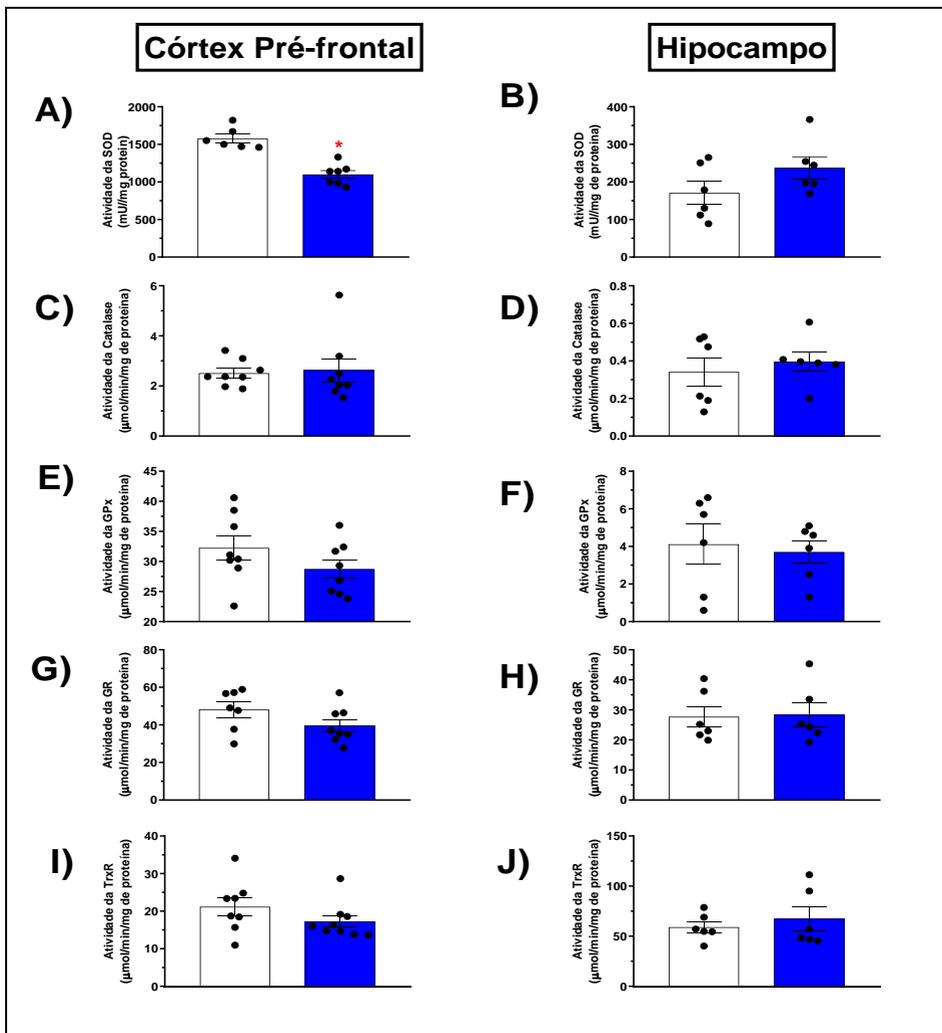


Figura 17. Exercício Físico aeróbico não altera atividade enzimática no encéfalo dos camundongos Swiss. Superóxido Dismutase (Painéis A e B). Catalase (Painéis C e D). Glutaciona Peroxidase (Painéis E e F). Glutaciona Redutase (Painéis G e H). Tiorredoxina Redutase (Painéis I e J).

5.5 Efeitos do exercício físico nos adutos de malondealdeído e 4-HNE no encéfalo dos camundongos.

Na literatura científica é demonstrado que o exercício físico pode acarretar dano oxidativo no tecido celular, dependendo do tipo de exercício e sua intensidade. Entretanto, o exercício físico é responsável por adaptar o organismo frente a produção de EROs que causam danos celulares, alterando a homeostase das defesas celulares (Davies et al., 1982; Neary et al., 1992; Schneider e Irigaray, 2008). Desta maneira, buscamos conforme a Figura 18, avaliar os efeitos do nosso protocolo de exercício físico aeróbico em moléculas indicadoras de lipoperoxidação no encéfalo dos camundongos. Os nossos resultados demonstram que o exercício físico aeróbico de *endurance* não teve efeito nos níveis de adutos de malondealdeído (Figura 18A e 18B) e de 4-HNE (Figura 18C e 18D) no hipocampo e no córtex pré-frontal

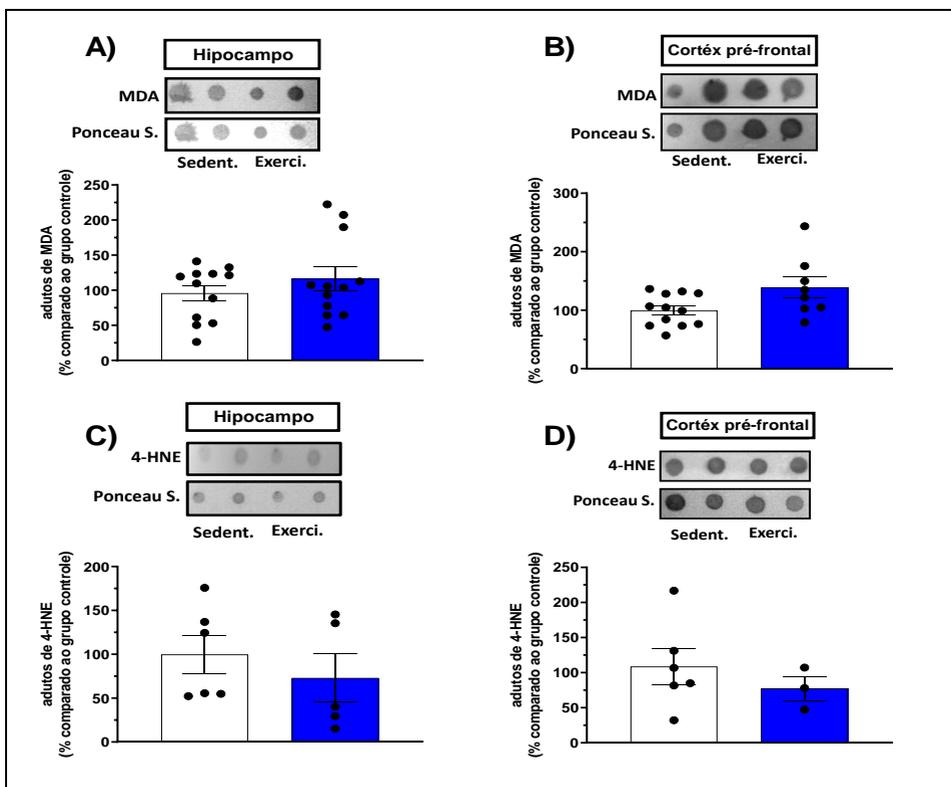


Figura 18. O exercício Físico aeróbico não aumentou marcadores de lipoperoxidação no hipocampo e no córtex pré-frontal dos camundongos. Malondealdeído (Painéis A e B). 4-HNE (Painéis C e D)

5.6 Efeitos do Exercício Físico em Parâmetros de Estresse Glicolítico

Buscamos avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico de *endurance* na produção do MGO, uma toxina endógena produzida principalmente pelo metabolismo da glicose (Synold, et al. 2008). Os níveis de MGO foram avaliados no córtex pré-frontal e no hipocampo dos camundongos. Observamos assim, que não houve alterações nos níveis de MGO no córtex pré-frontal (Figura 19A) e no hipocampo (Figura 19B) dos animais. Também avaliamos a atividade da enzima GLO1, cujo é uma importante enzima para detoxificação do MGO, entretanto não teve sua atividade modificada através do exercício físico.

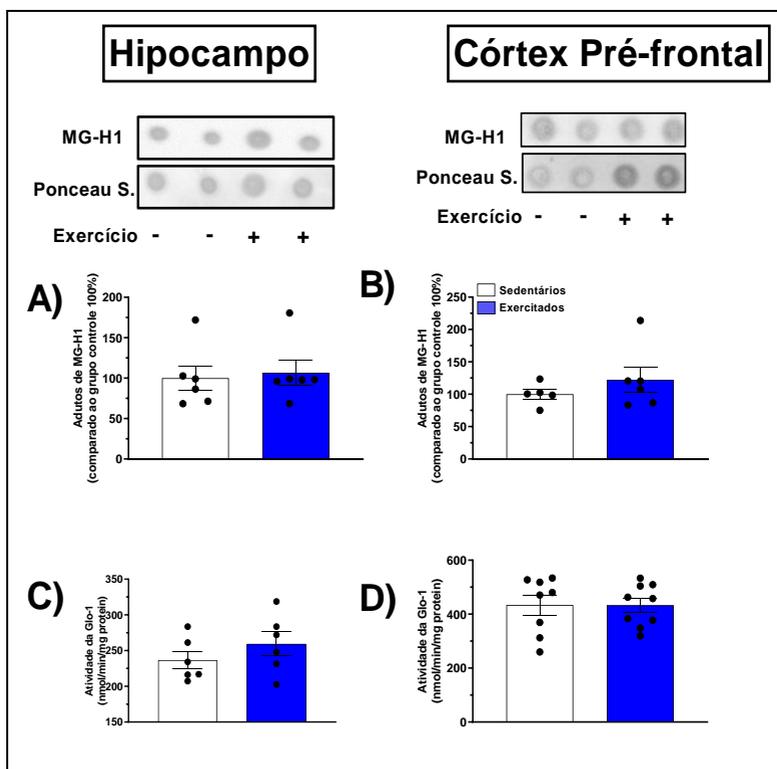


Figura 19. O exercício físico não teve efeito sob os níveis de MGO e nem no sistema de detoxificação do MGO. Níveis nos adutos de MGO no hipocampo (Painel A) e no córtex pré-frontal (Painel B). Atividade da enzima glioxalase-I no hipocampo (Painel C) e no córtex pré-frontal (Painel D)

5.7 Efeitos do Exercício Físico nos Níveis das Monoaminas no Encéfalo dos Camundongos

As monoaminas são importantes biomarcadores de alterações comportamentais (Coppen e Doogan, 1988; Mann et al., 1996; Wong e Licinio, 2001). Conforme avaliamos alterações comportamentais pelo nosso protocolo de exercício físico, buscamos avaliar os níveis de monoaminas no encéfalo nos animais exercitados e sedentários. Como observamos na Figura 20, analisamos que o nosso protocolo experimental não alterou os níveis das de serotonina e noradrenalina no córtex pré-frontal (Figuras 20A e D), no hipocampo (Figuras 20B e E) e no estriado (Figura 20C e F). Os níveis de dopamina foram aumentados no córtex pré-frontal, mas não no estriado cerebral, dos animais exercitados (Figura 20G)

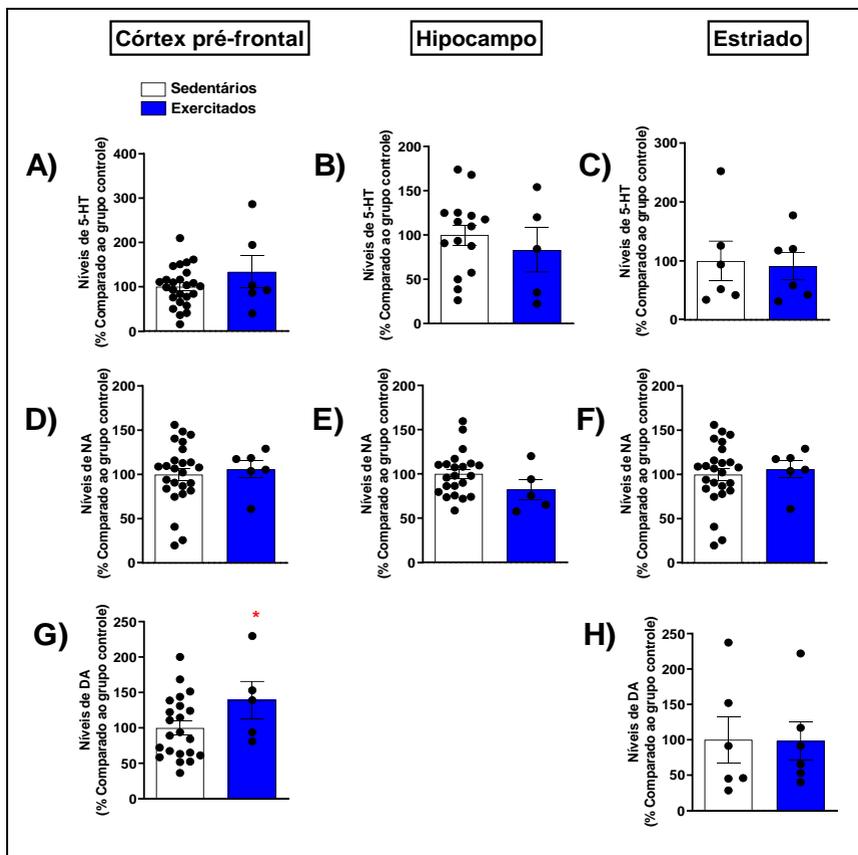


Figura 20. O exercício físico aeróbico alterou os níveis de dopamina no córtex pré-frontal, porém não alterou em outras estruturas. Níveis de 5-HT: córtex pré-frontal (Painel A), Hipocampo (Painel B) e Estriado (Painel C). Níveis de NA: córtex pré-frontal (Painel D), Hipocampo (Painel E) e Estriado (Painel F). Níveis de DA: córtex pré-frontal (Painel G) e Estriado (Painel H).

5.8 Efeito do Exercício Físico no conteúdo proteico de Irisina no eixo músculo-encefalo

O exercício físico é responsável por produzir e recrutar uma gama de moléculas, dentre elas está a Irisina, cujo é atribuída como uma das principais moléculas relacionada aos efeitos benéficos do exercício na saúde (Bostrom et al. 2012). Desta maneira analisamos o conteúdo proteico de Irisina no tecido muscular e encefálico dos camundongos exercitados e sedentários (Figura 21). Analisamos que o nosso protocolo de exercício

físico aeróbico não alterou os níveis de Irisina no gastrocnêmio (Figura 21A), quadríceps (Figura 21B) e no hipocampo (Figura 21C). Porém, o exercício físico foi responsável por aumentar os níveis de Irisina no córtex pré-frontal ($p < 0,05$) (Figura 21D).

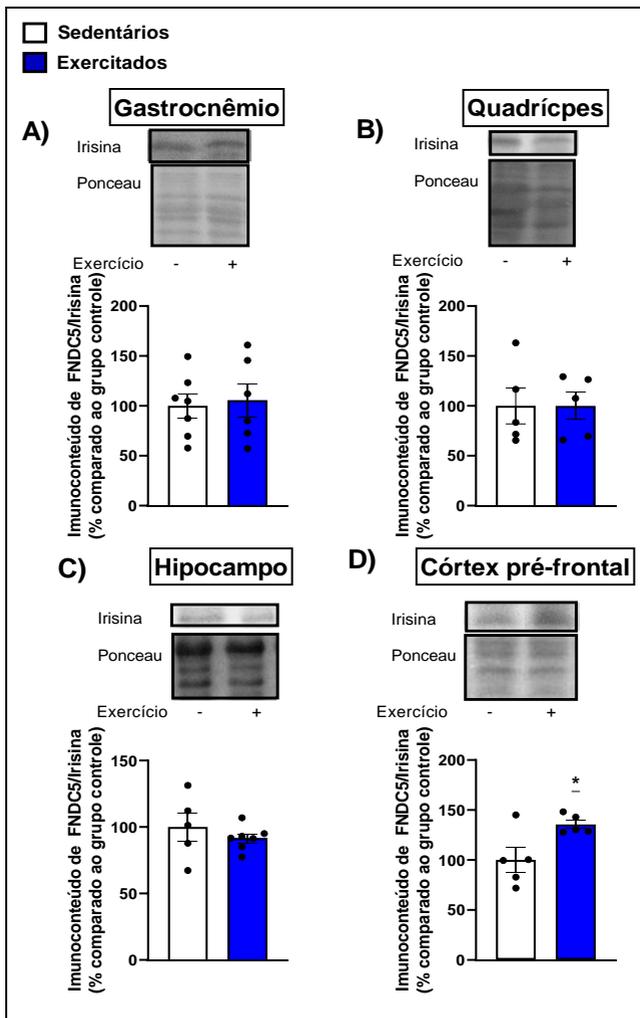


Figura 21. Os níveis de Irisina foram aumentadas com a prática de exercício físico no córtex pré-frontal, porém não alteraram nos músculos gastrocnêmio e quadríceps e no hipocampo. Níveis de Irisina no gastrocnêmio (Painel A), quadríceps (Painel B), hipocampo (Painel C) e córtex pré-frontal (Painel D).

6 DISCUSSÃO

Os efeitos do exercício físico são bem elucidados na clínica. Dentre seus benefícios clínicos, quando acompanhado de um estilo de vida saudável, o exercício na saúde física tem ações como na manutenção do peso corporal, diminuição de riscos cardiovasculares, cardiopatias, diabetes e câncer, além das melhoras nas aptidões físicas; na saúde mental o exercício age melhorando a qualidade do sono, cognição, humor, memória e também diminuindo os scores de depressão e ansiedade (Driver e Taylor, 1996; 2000; Jayakody et al., 2014; Kramer et al., 2006; de Souza Moura et al., 2015). Porém, os mecanismos biológicos que envolvem estas melhoras clínicas através do exercício ainda são pouco conhecidos. Desta maneira, realizamos um protocolo de exercício físico aeróbico de *endurance* na esteira por 8 semanas com o objetivo de avaliar os efeitos físicos, comportamentais e biológicos de camundongos *Swiss* jovens através da comunicação do eixo músculo-encéfalo via a miocina Irisina.

No presente trabalho analisamos o efeito do nosso protocolo de exercício no peso corpóreo dos animais ao longo das 8 semanas que realizamos o experimento, sendo a regulação do peso corpóreo importante para a prática de hábitos saudáveis e qualidade de vida. Observamos assim, que ao final do experimento o exercício físico aeróbico de *endurance* na esteira preveniu os animais exercitados de ganhassem mais peso quando comparado aos sedentários. Este efeito é demonstrado significativamente a partir da 6ª semana de exercício. Segundo a revisão bibliográfica, esta manutenção do peso corporal através do exercício físico pode se dar pela ação da Irisina nos adipócitos brancos, transformando estes adipócitos brancos em adipócitos marrons por um processo conhecido como “*Browning*”. Neste processo, a Irisina é responsável por estimular a expressão da proteína desacopladora 1 (UCP-1) nas mitocôndrias dos adipócitos. A UCP-1 é responsável por mediar a grande produção energética do tecido adiposo marrom, sendo uma proteína termogênica (Spielgman, 2013; Wu et al., 2012). O “*Browning*” é considerado um importante processo anti-obesidade, devido o recrutamento de acetil-Coa proveniente da quebra dos ácidos graxos para suprir a produção de ATP na respiração celular (Wu et al., 2012). Desta maneira, a prática de exercício físico é de suma importância para a regulação do peso corpóreo.

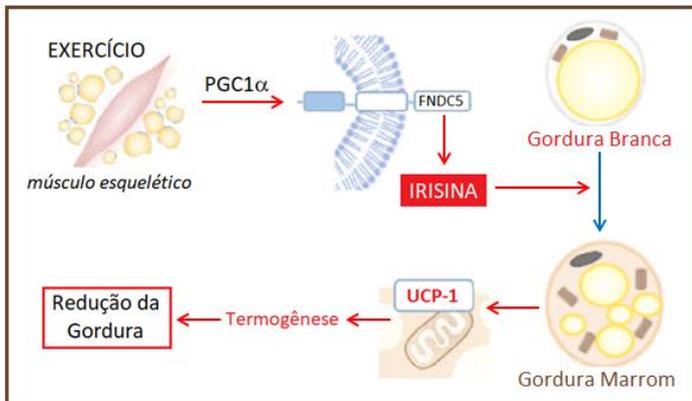


Figura 22. Irisina atua na manutenção do peso através do aumento da expressão de UCP-1. A Irisina é responsável por converter células adiposas brancas em células adiposas marrom através da indução de expressão da UCP-1 nas mitocôndrias. A UCP-1 é uma proteína termogênica. Desta maneira, reduzindo os níveis de gordura. Fonte: Adaptado de Lourenço et.al (2019)

Ao término das 8 semanas de exercício, nós exploramos os efeitos comportamentais do exercício físico nos animais. Inicialmente, usamos o teste do campo aberto para investigar os padrões comportamentais dos animais sedentários e exercitados. O teste do campo aberto é utilizado para avaliar parâmetros de locomoção e exploração, bem como comportamento do tipo-ansioso em roedores (Schmitt e Hiemke, 1998; Rodrigues et al., 2012). No TCA observamos que o nosso protocolo de exercício físico não alterou no número de levantamentos e cruzamentos no TCA. Porém, constatamos um efeito ansiolítico do exercício quando observamos que os animais submetidos ao protocolo de exercício físico tiveram um menor tempo de latência para sair do primeiro quadrante, um aumento na auto-limpeza e tiveram um maior tempo no centro aparato em comparação aos animais sedentários.

O transtorno depressivo é uma enfermidade que abrange o mundo todo, acometendo 1 a cada 6 adultos segundo Otte et. al. (2016). É uma doença que tem grande impacto na qualidade de vida do indivíduo, assim como no meio em que está inserido, como na família, ciclos sociais, relacionamentos e profissão (American Psychiatric Association, 2013). O tratamento da depressão é realizado na maioria das vezes por psicoterapia. Quando julgado necessário pelo médico, os fármacos antidepressivos são receitados. Porém, a estratégia psicofarmacológica somente afeta de 30 a 35% dos pacientes (Blumenthal et al. 1999), causando uma baixa adesão ao

tratamento da doença. Esta baixa adesão está relacionada ao alto custo do tratamento e seus efeitos colaterais. Desta maneira, é indicado por psicólogos e médicos a prática de realizar exercício físico regularmente, como uma forma de amenizar e prevenir os sintomas da depressão (American Psychiatric Association, 2013).

Buscamos então, no presente trabalho, os efeitos do exercício físico aeróbico de *endurance* no comportamento do tipo-depressivo e do tipo-anedônico. Utilizamos os testes do nado forçado e de suspensão pela cauda, pois ambos são testes preditivos de ação antidepressiva amplamente utilizados na pesquisa científica (Porsolt et al., 1977; Steru 1985). Em ambos os testes, foi mensurado o tempo de latência para imobilidade e de imobilidade dos animais. A ação de antidepressivos clássicos nestes testes, diminuem o tempo de imobilidade. Observamos, que o nosso protocolo aumentou o tempo de latência para imobilidade dos animais, e diminuiu o tempo que os animais permaneciam imóveis. Avaliando assim um efeito do tipo antidepressivo do nosso protocolo de exercício. É interessante ressaltar, que Cunha et. al. (2013) mostrou resultado similar em ambos os testes, através de exercício físico na roda de corrida voluntária por 21 dias.

Através dos testes de borrifagem de sacarose e preferência pela sacarose, buscamos analisar o comportamento do tipo-anedônico nos animais, sendo a anedonia um dos possíveis sintomas da depressão. Porém o nosso protocolo de exercício físico aeróbico de *endurance* não teve efeito neste parâmetro comportamental.

Conforme analisamos um efeito antidepressivo do exercício físico aeróbico de *endurance*, buscamos então compreender a relação dos efeitos comportamentais do nosso protocolo e a modulação neuroquímica.

É bem evidenciado na literatura que o exercício físico modula o sistema de transmissão monoaminérgico, especialmente, a dopamina, noradrenalina e serotonina (Frazer, 2005). Estas monoaminas são as principais reguladoras do comportamento motivacional, percepção e humor. Disfunções no sistema monoaminérgico destes neurotransmissores é relacionado aos transtornos de humor (Copen e Doogan, 1988; Mann et al., 1996; Wong e Licinio, 2001). Assim, mensuramos os níveis destas monoaminas em estruturas encefálicas dos animais sedentários e exercitados. Buscamos analisar possíveis alterações dos níveis de NA em estruturas cerebrais, devido a sua importância no humor, memória e cognição (Timmons, 2004). Entretanto, o exercício físico não alterou os níveis de NA em nenhuma estrutura encefálica analisada. Todavia, trabalhos demonstram que o exercício físico na roda livre suprime a liberação de NA pelo *locus coeruleus* em modelos de estresse inescapável, sendo assim um mecanismo de resistência ao estresse praticado pelo

exercício (Greenwood et al., 2003). Entretanto, outros trabalhos demonstram que o exercício físico crônico na esteira aumenta os níveis de NA em regiões encefálicas associadas a cognição, incluindo o hipocampo (Sarbadhikari e Saha, 2006). Reforçando a importância da modulação dos níveis de NA no encéfalo pelo exercício físico no controle da emocionalidade, Cunha et al. (2013) demonstrou que o efeito antidepressivo do exercício físico pode ser abolido pelo tratamento dos animais com AMPT (um inibidor da síntese de NA e DA). Assim como a NA, a 5-HT não sofreu alterações pela prática de exercício físico nas estruturas cerebrais que analisamos. De acordo com a revisão na literatura científica, o exercício moderado na esteira por um período de 4 semanas não implica em alterações metabólicas da 5-HT no hipocampo (Chen et al., 2008). Em contrapartida, Weicker e Struder (2001) demonstram que o exercício físico pode aumentar a síntese de 5-HT induzindo a produção de triptofano (precursor da 5-HT) no encéfalo.

Um achado importante do nosso trabalho, demonstrou que o exercício físico aeróbico aumentou os níveis de DA no córtex pré-frontal dos camundongos. Os efeitos benéficos do exercício físico associado à uma regulação do sistema dopaminérgico foi demonstrada em modelos de Doença de Parkinson, a partir de lesões em neurônios dopaminérgicos (Tajiri et al., 2009). Friedman et al. (2007) postulou em seu trabalho que o sistema dopaminérgico mesolímbico e mesocortical estão envolvidos em dois sintomas crassos da depressão, a anedonia e a desmotivação. Em outro trabalho, Sutoo e Akiyama (2003), demonstraram que o exercício físico de corrida em camundongos aumentou os níveis de dopamina no neocórtex (subdivisão do córtex). Na revisão bibliográfica, encontramos uma possível relação entre baixos níveis de dopamina na *substância nigra* e a anedonia de pacientes com transtorno depressivo (Nestler e Carlezon, 2006).

A literatura científica reporta extensivamente que a ação contrátil dos músculos causa um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (Davies et al., 1982; Neary et al., 1992; Schneider e Irigaray, 2008). Desta maneira, é postulado que o exercício físico ao aumentar os níveis de EROs, se adapte aumentando os níveis de defesas antioxidantes (Farooqui et al., 2012).

Nós buscamos então avaliar a ação do exercício físico de *endurance* no dano oxidativo e no sistema adaptativo antioxidante no encéfalo dos camundongos. Observamos assim, que o nosso protocolo não alterou os níveis de indicadores de peroxidação lipídica e nem defesas antioxidantes no encéfalo dos camundongos. Analisando a revisão bibliográfica, o trabalho de Laires et al. (1993) não encontrou diferença significativa nas

defesas antioxidantes em corredores que foram analisadas 3 min antes e 40 min depois da corrida. Porém, em exercícios de alta intensidade em sessão única analisadas por Quindry et. al. (2013) foi observado um possível aumento de marcadores oxidativos (ânion superóxido) no sangue. Alguns trabalhos demonstram a existência de uma resposta adaptativa ao treino de *endurance* e está diretamente associada a um aumento na expressão e atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPX/GR (Sen et al. 2001; Miyazaki et al. 2001). Em um protocolo semelhante ao que realizamos, camundongos machos da linhagem CF1 participaram de corrida na esteira por 8 semanas (3x ao dia) em velocidade constante de 13 m/min, apresentaram aumento na atividade da SOD no coração e no fígado (Tromm et al., 2012). Desta maneira podemos dizer que a relação entre exercício físico e dano oxidativo é bastante variável, dependendo do modelo de estudo, do tipo e da intensidade do exercício físico, assim como foi introduzido neste trabalho. Conforme alguns trabalhos científicos demonstram, a ação contrátil do músculo durante o exercício físico aumenta os níveis de EROs, em resposta as EROs, o NRF-2 conjugado a proteína *Kelch-like- ECH-associated protein 1* (KEAP1) no citosol se dissocia da KEAP1 e se transloca para o núcleo, promovendo a expressão de GSH através do fator de transcrição *antioxidant-response elemento* (ARE), sendo a GSH importante na detoxificação do MGO via ciclo das glioxalases (Dieter e Vella, 2013). Além de que, o nosso grupo de pesquisa identificou níveis de MGO aumentado no encéfalo, após administração de MGO, induz comportamento do tipo-depressivo em camundongos (Almeida, 2016). Buscamos então avaliar se o nosso protocolo de exercício físico aeróbico de *endurance* agiu sobre os níveis de MGO encéfalo. Constatamos então que o nosso protocolo não teve efeito nos níveis de MGO no córtex pré-frontal e nem no hipocampo,

Conforme os efeitos clínicos do exercício físico sejam bem estabelecidos, busca-se compreender melhor os mecanismos biológicos envolvidos nestes efeitos clínicos. A ação contrátil dos músculos durante o exercício acarreta na biossíntese de moléculas oxidativas (Davies et al., 1982; Neary et al., 1992; Schneider e Irigaray, 2008), consequentemente as células musculares desencadeiam respostas adaptativas com indução de cascatas bioquímicas produzindo biomoléculas que terão ação em diferentes órgãos do corpo. Desta maneira, algumas miocinas são postuladas como as agentes das ações clínicas associadas ao exercício físico.

A Irisina, uma miocina descoberta em 2012, atualmente é uma das principais moléculas conhecidas associadas aos benefícios clínicos do exercício físico (Bostrom et al., 2012). Desde a sua descoberta, vários

trabalhos vêm sendo publicados mostrando seus efeitos bioquímicos e clínicos. Como discutimos anteriormente, a Irisina está diretamente relacionada a manutenção do peso, devido a sua propriedade de induzir a expressão de UCP-1 nas mitocôndrias do tecido adiposo branco convertendo-as em tecido adiposo marrom (Spielgman, 2013; Wu et al., 2012).

Conforme analisadas as referências bibliográficas, buscamos, como objetivo principal deste trabalho, avaliar os efeitos do exercício físico aeróbico de *endurance* na esteira sobre o comportamento do tipo-depressivo mediado pela miocina Irisina, em camundongos. Para isso, analisamos os níveis de Irisina tanto nos músculos quanto no encéfalo dos animais, para analisar conversação do eixo músculo-encéfalo. Observamos então, que o nosso protocolo não alterou os níveis de Irisina em dois diferentes tipos de músculos dos animais: gastrocnêmio e quadríceps, músculos que apresentam de forma equilibrada tanto fibras glicolíticas, quanto oxidativas (Lehninger, 2011). De forma interessante, os efeitos do exercício físico na expressão de Irisina em camundongos foram demonstrados por Brenmoehl et al., (2014). Estes autores demonstraram que o exercício crônico na roda de corrida voluntária não alterou os níveis de Irisina no musculo esquelético e no sangue, enquanto uma exposição ao exercício físico na esteira aumentou os níveis de Irisina no tecido muscular e no sangue. Colaianni et al., (2014) também demonstrou que a atividade física na roda de corrida voluntaria por 6 semanas aumenta a expressão de Irisina em mioblastos de camundongos da linhagem C57BL/6. Peterson et al., (2014) também realizou um protocolo na esteira por 9 semanas com ratos Zuckers magros e obesos, e não observou diferença nos níveis de Irisina no musculo do diafragma dos animais exercitados.

Por fim, analisamos que os níveis de Irisina estão aumentados no córtex pré-frontal dos animais treinados. Trabalhos recentes, Siteneski et al., (2017) avaliou que administração central da Irisina teve efeito antidepressivo nos camundongos, diminuindo o tempo de imobilidade no TSC e TNF. Neste mesmo trabalho, também foi observado que a administração de Irisina teve efeito do tipo-ansiolítico no TCA, aumentando o tempo dos animais no centro do aparato. Além disso, outros trabalhos demonstram que a administração de Irisina reverte o comportamento depressivo em camundongos que passaram por um protocolo de ECI (Pan e Wang, 2016).

Alguns trabalhos demonstram que a modulação do FNDC5/Irisina regula a expressão do BDNF (Wrann et al., 2013; Siteneski et al., 2017). Sendo o BDNF um importante fator trófico que tem ação no nascimento,

crescimento e sobrevivência de novos neurônios, induzindo respostas comportamentais e humorais (Popova et al., 2017).

Loureço et al., (2019) analisou comprometimento da memória e de sinapses em modelos de Doença de Alzheimer. Neste trabalho, o grupo de pesquisa liderado pela professora Dra. Fernanda Guarino de Felice da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) observou que os níveis de Irisina eram reduzidos em modelos experimentais da doença de Alzheimer, e a superexpressão da Irisina ajudou na recuperação da plasticidade sináptica e da memória nestes modelos. Conforme observamos em nosso trabalho e no trabalho de Lourenço e colegas (2019), que os níveis de Irisina estejam aumentados em diferentes estruturas encefálicas dos camundongos, podemos pressupor que a ação da Irisina parece estar associado em melhoras comportamentais.

7 CONCLUSÃO

O nosso protocolo de exercício físico aeróbico de *endurance* na esteira foi responsável pelas seguintes ações nos camundongos *Swiss*:

- Manutenção do peso corpóreo nos animais, evitando um ganho de peso;
- Maior tempo no centro do aparato, número de limpeza e um menor tempo para sair do primeiro quadrante, indicando um efeito do tipo ansiolítico do exercício físico
- Efeito do tipo antidepressivo semelhante ao efeito de fármacos antidepressivos clássicos no TNF e TSC;
- Aumentou os níveis de dopamina no córtex pré-frontal;
- Aumentou o imunoconteúdo de Irisina no córtex pré-frontal.

Desta maneira, podemos concluir que o efeito tipo antidepressivo do exercício físico aeróbico de *endurance* pode ter ocorrido através da modulação da dopamina e da Irisina no encéfalo. Estes achados são importantes para uma melhor compreensão de como a comunicação do eixo músculo esquelético-encéfalo modula o comportamento e as vias neuroquímicas implicadas em tratamentos antidepressivos e ansiolíticos, podendo assim, ser um importante alvo terapêutico para tratamentos em que o transtorno depressivo coexista com a ansiedade.

8 PERSPECTIVAS

Através do mesmo protocolo de exercício físico aeróbico de *endurance*, buscar:

- Analisar os níveis de BDNF no córtex pré-frontal, estriado e hipocampo de animais submetidos ao protocolo de exercício físico
- Avaliar possíveis implicações na expressão e fosforilação de PGC-1 α em tecidos de animais submetidos ao protocolo de exercício físico
- Analisar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, GR, Glo-1 e TrxR nos tecidos musculares de animais submetidos ao protocolo de exercício físico
- Realizar outros testes comportamentais como testes de memória e teste de interação social em animais submetidos ao protocolo de exercício físico aeróbico

9 REFERÊNCIAS

Adlard PA., Cotman CW. (2004). Voluntary exercise protects against stress-induced decreases in brain-derived neurotrophic factor protein expression. *Neuroscience*. 124(4): 985-992.

Aebi H. (1985). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 105: 121–126.

Ahmed, et al. (1997). N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins.; *Biochem. J*. 324, 565.

Allen RE., Thornalley PJ. (1993). Simple chromatographic methods for the purification of human red blood cell glyoxalase I and glyoxalase II to homogeneity. *Biochemical Society Transactions*. 21(2): 171.

Almeida GR., Dafre AL. (2016). Comportamento do tipo-depressivo, ansiolítico e alterações neuroquímicas induzidas pelo metilglioal, uma toxina endógena. *Dissertação (Dissertação em bioquímica) – UFSC. Santa Catarina*.

Arnér ES, Holmgren A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. 267: 6102–6109.

Aydin S. (2014). Three new players in energy regulation: preptin, adropin and irisin. *Peptides*. 56: 94–110.

Beltran Valls MR, et al. (2014). Explosive type of moderate-resistance training induces functional, cardiovascular, and molecular adaptations in the elderly. *Age*. 759-722.

Beisswenger, PJ. et al. (1999). Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes*, 48:198–202.

Blizzard LeBlanc DR., Rioux BV., Pelech C. (2017). Exercise-induced irisin release as a determinant of the metabolic response to exercise training in obese youth: the EXIT trial. *Physiological Reports*. 5(23).

Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. (2012). A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fatlike development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 481:463-8.

Brenmoehl et al. (2014). Irisin Is Elevated in Skeletal Muscle and Serum of Mice Immediately after Acute Exercise. *International journal of biological sciences*. 10(3): 338-349

Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414(13): 813-20.

Carlberg I., Mannervik B. (1985). Glutathione reductase assay. *Methods in Enzymol.* Academic Press. 113: 484–495.

Caspersen, CJ., Powell, KE., Christenson, GM. (1985). Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep.* 100: 126–131.

Celada P., Puig M., Amargos-Bosch M., Adell A, Artigas F. (2004). The therapeutic role of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci.* 29:252-265.

Charney DS., Heninger GR., Sternberg, DE., Roth, RH. (1981). Plasma MHPG indepression: Effects of acute and chronic desipramine treatment. *Psychiatry Research.* 5: 217.

Chen HI., Lin LC., Yu L., Liu YF., Kuo YM., Huang AM., Chuang JI., Wu FS., Liao PC., Jen CJ. (2008). Treadmill exercise enhances passive avoidance learning in rats: The role of down-regulated serotonin system in the limbic system. *Neurobiol. Learn. Mem.* 89:489–496.

Clanton TL, Zuo L, Klawitter P. (1999). Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222(3): 253-62.

Close, GL, Kayani, A., Vasilaki, A., & McArdle, A. (2005). Skeletal Muscle Damage with Exercise and Aging. *Sports Medicine.* 35(5), 413–427.

Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30(9): 464-72.

Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 30(2): 280-4.

Coppen AJ., Doogan DP. (1988). Serotonin and its place in the pathogenesis of depression. *J Clin Psychiatry.* 4: 11.

Cunha MP. et al. (2013). The antidepressant-like effect of physical activity on a voluntary running wheel. *Med Sci Sports Exerc.* 45(5):851-9.

Davies KJ., Quintanilha, AT., Brooks G.A., Packer L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1198–1205.

De Benedetto GE., Fico D., Pennetta A., Malitesta, C., Nicolardi G., Lofrumento DD., De Nuccio F., La Pesa V. (2014). A rapid and simple method for the determination of 3,4- dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 98: 266–270.

de Souza Moura AM., Lamego MK., Paes F., Ferreira Rocha, NB., Simoes-Silva V., Rocha SA., de Sá Filho AS., Rimes R., Manochio J., Budde H., et al. (2015). Effects of Aerobic Exercise on Anxiety Disorders: A Systematic Review. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 14: 1184–1193

Dieter BP., Vella CA. (2013). A proposed mechanism for exercise attenuated methylglyoxal accumulation: activation of the ARE-Nrf pathway and increased glutathione biosynthesis. *Med. Hypotheses.* 81: 813–815

Distler MG., Palmer AA., (2012). Role of Glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights. *Front Genet.* 3:250.

Distler MG. et al. (2012). Glyoxalase 1 increases anxiety by reducing GABAA receptor agonist methylglyoxal. *The Journal of Clinical Investigation.* 122(6): 2306–2315.

Duman RS., Monteggia, LM. (2006). A neurotrophic model for stressrelated mood disorders. *Biol Psychiatry.* 59(12): 1116-1127.

Dutra F, Knudsen FS., Curi D., Bechara EJ. *Chem. Res.* (2001). *Toxicol.* 14: 1323.

Driver HS., Taylor, SR. (2000). Exercise and sleep. *Sleep Med. Rev.* 4: 387–402.

Erickson KI. et al. (2011). Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci.* 108(7): 3017-3022.

Farooqui A. Farooqui T. Panza F. Frisardi V. (2012). Metabolic syndrome as a risk factor for neurological disorders. *Cellular and molecular life Sciences.* 69(5): 741-762.

Ferreira ALA., Matsubara LS. Radicais livres: (1997). conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. RAMB. 43(1): 61-8.

Finaud J., Lac G., Filaire E. (2006). Oxidative stress. Relationship with exercise and training. Sports Med. 36(4): 327-58.

Fowler SC, Zarconi TJ, Vorontsova E, Chen R. (2002). Motor and associative deficits in D2 dopamine receptor knockout mice. Int. J. Dev. Neurosci. 20: 309-321.

Franz, S.I.; Hamilton, G.V. (1905). THE EFFECTS OF EXERCISE UPON THE RETARDATION IN CONDITIONS OF DEPRESSION. American Journal of Insanity. 62: 239-256.

Frazer CJ, Christensen H, Griffiths KM. (2005). Effectiveness of treatments for depression in older people. Med J Aust. 182(12): 627-32.

Friedman A., Yadid G., Deri I., Dremencov E., Friedman Y., Goutkin S., Kravchinsky E., Mintz M., Levi D., Overstreet DH. (2007) Decoding of dopaminergic mesolimbic activity and depressive behavior. Journal of molecular neuroscience. 32: 72-79

Greenwood BN., Kennedy S., Smith TP., Campeau S., Day HE., Fleshner M. (2003). Voluntary freewheel running selectively modulates catecholamine content in peripheral tissue and c-Fos expression in the central sympathetic circuit following exposure to uncontrollable stress in rats. Neuroscience. 120:269-281.

Hamsch, B., et al. (2010). Methylglyoxal-mediated anxiety involves increased protein modification and elevated expression of glyoxalase in the brain. Journal of Neurochemistry. 113(5): 1240-1251.

Halliwell B., Gutteridge JMC. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol. 186: 1-85.

Halliwell B, Gutteridge JMC. (2007). Free Radical in Biology and Medicine. ed. Oxford: Oxford University Press. 4: 704.

Haralambie G, Mossinger M. (1998). Metabolites of the aminoacetone pathway in blood after exercise. Metabolism. 29: 1258-1261

Holmgren, A. Thioredoxin. Annu. Rev. Biochem. 1985; 54: 237-271

Hovatta, I., et al. (2005). Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. Nature. 438(7068): 662-666.

Hutton CP., et al. (2015). Synergistic effects of diet and exercise on hippocampal function in chronically stressed mice. *Neuroscience*. 308:180-93.

Jang S.-W., Liu X., Yepes M., et al. (2010). A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107(6): 2687–2692.

Jayakody K., Gunadasa S., and Hosker C. (2014). Exercise for anxiety disorders: systematic review *BR. Journey Sports Med*. 48: 187–196.

Jenck F., Moreau JL., Mutel V., Martin JR. (1994). Brain 5-HT_{1C} receptors and antidepressants. 18(3): 563-574.

Jedrychowski MP., Wrann CD., Paulo JA., Gerber KK., Szpyt J., Robinson MM., Nair KS., Gygi SP., Spiegelman BM. (2015). Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. *Cell Metab*. 22(4): 734-740.

Kalapos MP. (1999). Methylglyoxal in living organisms. *Toxicology Letters*, 110(3): 145–175.

Karege F., Vaudan G., Schwald M., Perroud N., La Harpe R. (2005). Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res*. 136: 29–37.

Kim B, Feldman EL. (2015). Insulin resistance as a key link for the increased risk of cognitive impairment in the metabolic syndrome. *Exp Mol Med*. 47: 149.

Kramer AF., Erickson, KI., Colcombe SJ. (2006). Exercise, cognition, and the aging brain. *J. Appl. Physiol.* Bethesda Md. 101, 1237–1242.

Kuhla B. et al. (2005). Methylglyoxal, glyoxal, and their detoxification in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1043:211–216.

Koury JC., Donangelo CM. (2003). Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr*. 16(4): 433-41.

Laires MJ et al. (1993). Preliminary study of the relationship between plasma and erythrocyte magnesium variations and some circulating pro-oxidant and antioxidant indices in a standardized physical effort. *Magnes Res*. 6(3): 233-8.

Lawson EC., Han MK., Sellers TJ., Chrenek MA., Hanif A., Gogniat MA., Boatright JH., Pardue MT. (2014). Aerobic Exercise Protects Retinal Function and Structure from Light-Induced Retinal Degeneration. *J neuroscience*. 34(7): 2406-2412.

Lima FD. et al. (2008). Na⁺, K⁺-ATPase activity impairment after experimental traumatic brain injury: relationship to spatial learning deficits and oxidative stress. *Behavioural brain research*. 193(2): 306-310.

Lucki I. (1991). Behavioral studies of serotonin receptor agonists as antidepressant drugs. *J Clin Psychiatry*.; 24: 31.

Mann JJ. et al. (1996). Demonstration in vivo of reduced serotonin responsivity in the brain of untreated depressed patients. *The American Journal of Psychiatry*, 153: 174–182.

Misra HP., Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journey Biology Chem.*; 247: 3170–3175.

Miyazaki H., Oh-ishi S., Ookawara T., Kizaki T., Toshinai K., Ha S., Haga S., Ji LL., Ohno H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol*. 84(1-2): 1-6.

Monnier VM., Sell D.R, Genuth S. (2005). Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. *Ann NY Acad Sci*.; 1043: 567-81.

Moreno-Navarrete JM, Ortega F, Serrano M, Guerra E, Pardo G, Tinahones F. et al., (2013). Irisin Is Expressed and Produced by Human Muscle and Adipose Tissue in Association With Obesity and Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 98: 769-778

Musemeci G. (2015). Effects of exercise on physical limitations and fatigue in rheumatic diseases. *World Journey Orthopedy*. 6(10): 762-769.

Neary JP., Martin TP., Reid DC., Burnham R., Quinney HA. (1992). The effects of a reduced exercise duration taper programme on performance and muscle enzymes of endurance cyclists. *Eur. J. Appl. Physiol*. 65, 30–36.

Nestler EJ., Calerzon WA jr. (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*. 59(12): 1151-1159.

Ordway, GA. et al. (1999). Quantitative distribution of monoamine oxidase A in brainstem monoamine nuclei is normal in major depression. *Brain Research*. 847(1): 71-79.

Orosz, F., Oláh, J., Ovádi, J. (2009). Triosephosphate isomerase deficiency: New insights into an enigmatic disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Mitochondrial Disease*. 1792(12): 1168–1174.

Otte C. et al. (2016). Major depressive disorder. *Nat Rev Dis Primers*. 2: 16065.

Papp C., Pak K., Erdei T., Juhasz B., Seres I., Szentpeteri A., Kardos L., Szilasi, M., Gesztelyi R., Zsuga J. (2017). Alteration of the irisin-brain-derived neurotrophic factor axis contributes to disturbance of mood in COPD patients. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon*. 12: 2023-2033.

Pedersen BK., Fischer CP. (2007). Beneficial health effects of exercise - the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol. Sci*. 28: 152-156.

Popova NK., Ilchibaeva TV., Naumenko, VS. (2017). Neurotrophic Factors (BDNF and GDNF) and the Serotonergic System of the Brain. *Biochemistry*. 82(3): 308-317.

Porsolt RD., Bertin A., Jalfre M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 229(2): 327-336.

Prado VF. et al. (2006). Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*; 51: 601-612.

Quindry J. et al. (2013). Environmental temperature and exercise-induced blood oxidative stress. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*. 23(2):128-136.

Reid MB. (2001). Plasticity in skeletal muscle, and smooth muscle. Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol*. 90(2): 724-31.

Rodrigues, AL. et al. (1996). Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol Toxicol*. 79(3): 150-156.

Rosenblat, JD. et al. (2015). Beyond Monoamines-Novel Targets for Treatment-Resistant Depression: A Comprehensive Review. *Current Neuropharmacology*. 13(5): 636–655.

Rossi, A., Barraco A., Donda P. (2004). Fluoxetine: a review on evidence based medicine. *Annals of General Hospital Psychiatry*. 3: 2

Russo-Neustadt A., Beard RC., Cotman CW. (1999). Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology*. 21(5): 679-82.

Sarbadhikari SN., Saha AK. Moderate exercise and chronic stress produce counteractive effects on different areas of the brain by acting through various neurotransmitter receptor subtypes: A hypothesis. *Theor. Biol. Med. Model*. 2006; 3:33.

Sureda A., Tauler P., Aguilo A., Cases N., Fuentespina E., Córdova A., et al. (2005). Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Rad Res*. 39(12):1317-24.

Schmitt U., Hiemke, C. (1998). Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*. 59(4): 807–811.

Schneider CD., Oliveira AR. (2004). Oxygen free radicals and exercise: the mechanisms of formation and adaptation to physical training. *RBME*. 10(10): 308-13.

Schneider RH., Irigaray, TQ. (2008). The process of aging in today's world: chronological, biological, psychological and social aspects. *Estud. Psicol. Camp*. 25, 585–593.

Schumacher MA., Chinnam N., Ohashi T., Shah RS., Erickson HP. The structure of irisin reveals a novel intersubunit beta-sheet fibronectin type III (FNIII) dimer: implications for receptor activation. *Journey Biol. Chem*. 2013; 288(47): 33738-33744

Sen CK. et al. (2001). Exercise: induced oxidative stress and antioxidant nutrients. *Nutrition in sports*. Oxford: Blackwell. 7: 22.

Siteneski A., Cunha MP., Lieberknecht V., Pazini FL., Gruhn K., Brocardo PS., Rodrigues ALS. (2017). Central irisin administration affords antidepressant-like effect and modulates neuroplasticity-related genes in the hippocampus and prefrontal cortex of mice. 84: 294-203.

Smith MA., Reid MB. (2006). Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle. *Resp Physiol Neurobiol.* 151(2-3): 229-41.

Spiegelman BM. (2013). Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. *Diabetes.*62(6):1774-82.

Seale P. (2013). Brown adipose tissue biology and therapeutic potential. *Front Endocrinol.* 4(14):1-2.

Stahl, SM. (1994). 5HT1A receptors and pharmacotherapy. Is serotonin receptor down-regulation linked to the mechanism of action of antidepressant drugs? *Psychopharmacol Bull.* 30(1): 39- 43.

Stahl, SM. (1998). Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Affect Disord.* 51(3): 215-35.

Steru L. (1985). et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology.* 85(3):367-370.

Sutoo D., Akiyama K. (2004). Music improves dopaminergic neurotransmission: demonstration based on the effect of music on blood pressure regulation. *Brain Reser.* 1016(2): 255-62.

Synold, T., et al. (2008). Advanced glycation end products of DNA: quantification of N2-(1-Carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in biological samples by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chem Res. Toxicol.*

Thornalley, PJ. (1993). Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-A role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *General Pharmacology: The Vascular System,* 27(4): 565–573.

Torres, GE.; Gainetdinov, RR.; Caron, MG. (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci.* 4(1): 13-25.

Touyz RM., Schiffrin EL. (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 122(4): 339-52.

Tromm CB. et al. (2012). Efeito de diferentes frequências semanais de treinamento sobre parâmetros de estresse oxidativo. *Rev. bras. cineantropom. desempenho hum.* 14(1):

Tung BT., Rodríguez-Bies E., Talero E, Gamero-Estévez E, Motilva V, Navas P. (2015). Anti-inflammatory effect of resveratrol in old mice liver. *Exp. Gerontol.* 64:1–7.

Uchiyama S., Tsukamoto H., Yoshimura S., Tamaki T. (2006). Relationship between oxidative stress in muscle-tissue and weight-lifting-induced muscle damage. *Pflugers Archiv, Eur J Physiol.* 452(1): 109-116.

van Praag H, Kempermann G, Gage FH. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 2: 266-270.

Yamada K., Mizuno M., Nabeshima T. (2002). Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.* 70: 735-744.

Yan SF., Ramasamy, R., Schmidt, AM. (2009). The receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and cardiovascular disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 2: 5.

Weicker H, Strüder HK (2001). Influence of exercise on serotonergic neuromodulation in the brain. *Amino Acids.*20(1):35-47

Wendel A. (1981). Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymology.* 77: 325-333.

Willner P. et al. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology.* 1987; 93(3): 358-364.

Willner P. (2005). Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.* 52: 90-110.

Wong M.-L., Licinio, J. (2001). Research and treatment approaches to depression. *Nature Reviews Neuroscience.* 2(5): 343–351.

World Health Organization (WHO). Depression and other common mental disorders: global health estimates. World Health Organization. 2017.

Wrann CD., White JP., Salogiannis J., Laznik-Bogoslavski D., Wu J., Ma D., Lin JD., Greenberg ME., Spiegelman BM. (2013). Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1alpha/FNDC5 pathway. *Cell Metab.* 18(5): 649-659.

Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 150(2): 366-76.