



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JULIA MACEDO ROSA

EFEITO PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O COMPORTAMENTO
TIPO-DEPRESSIVO E ALTERAÇÕES NA PLASTICIDADE HIPOCAMPAL E NO
EIXO INTESTINO-MICROBIOTA-CÉREBRO INDUZIDOS POR $A\beta_{1-40}$

FLORIANÓPOLIS

2019

JULIA MACEDO ROSA

EFEITO PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O COMPORTAMENTO
TIPO-DEPRESSIVO E ALTERAÇÕES NA PLASTICIDADE HIPOCAMPAL E NO
EIXO INTESTINO-MICROBIOTA-CÉREBRO INDUZIDOS POR $A\beta_{1-40}$

Tese de Doutorado
apresentada à Universidade
Federal de Santa Catarina
como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutora
em Bioquímica. Orientador:
Prof Dra. Ana Lúcia Severo
Rodrigues

FLORIANÓPOLIS

2019

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

Rosa, Julia Macedo

Efeito profilático do exercício físico sobre o comportamento tipo-depressivo e alterações na plasticidade hipocampal e no eixo intestino-microbiota-cérebro induzidos por A β 1-40 / Julia Macedo Rosa ; orientador, Ana Lúcia Severo Rodrigues , 2019.

157 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Depressão. 3. doença de Alzheimer. 4. exercício físico. 5. eixo intestino-microbiotacérebro. I. , Ana Lúcia Severo Rodrigues. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Julia Macedo Rosa

Título: Efeito profilático do exercício físico sobre o comportamento tipo-depressivo e alterações na plasticidade hipocampal e no eixo intestino-microbiota-cérebro induzidos por $A\beta_{1-40}$

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Ionara Siqueira Rodrigues, Dra.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Carla Inês Tasca, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em pelo Programa de Pós Graduação em Bioquímica.

Prof. Dr.(a) Ariane Zamoner Pacheco de Souza

Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr.(a) Ana Lúcia Severo Rodrigues

Orientador(a)

Florianópolis, 8 de agosto de 2019.

À minha mãe

AGRADECIMENTOS

Primeiro gostaria de agradecer a minha Mãe. Quem diria Dona Maria, que a filha da doméstica seria doutora. Conseguimos!!! E dedico essa conquista a você. Muito obrigada por todo o apoio, por nunca ter deixado eu desistir dos meus sonhos. Muito obrigada por todos os lanchinhos na madrugada enquanto eu estudava, por todos os potes de marmitta de sopa. Chegar em casa cansada e ter sua sopa me esperando, significa muito pra mim, representa todo amor e cuidado que você sempre teve comigo. Muito Obrigada também por me apoiar na minha nova caminhada, graças a formação que você me proporcionou hoje posso buscar novas oportunidades pelo mundo. Nós passamos por tanta coisa juntas nesses últimos anos e estamos cada vez mais fortes e unidas. Te amo mais que tudo!!

Meu pai por sempre me incentivar a seguir meus sonhos e mostrar que estudo é o melhor caminho, para que meus sonhos se tornem realidade. De tanto falar “Estuda filha, estuda”, olha aonde cheguei! Muito Obrigada, Te amo!

Prof Ana, tenho tanto pra agradecer que nem sei por onde começar. Nesses quase 10 anos de lab sua participação na minha formação profissional e pessoal foi essencial. Muito obrigada por tudo, por todos os ensinamentos, pela paciência, pelos conselhos enfim, por tudo. Como sempre falo a prof tem essa capacidade maravilhosa de ir nos moldando e nos transformar em pessoas melhores, sou muito grata por fazer parte do time dos alunos da Prof Ana. Obrigada por permitir que eu me aventurasse em novas técnicas e assuntos. E por estudar comigo tudo sobre histologia e eixo intestino-microbiota-cérebro.

Franciiiiiiiiiiiiiiiiiiiiis, sério né? O que dizer desses quase 10 anos que você me atura?! Muito obrigada por sempre ter cuidado de mim, por tratar como irmãzinha e me dar puxões de orelha quando necessário, por me salvar com caronas de moto para eu não ir embora sozinha a noite do lab, pelos momentos que percebia que eu estava triste me chamava pra comer besteira e tomar muita coca cola. Por acordar cedo nos finais de semana para vir fazer experimentos comigo hahah por todos nossos almoços no RU #parceria, por tentar me ensinar a jogar vídeo game. Você é um amigo irmão maravilhoso. Te amo migozorruxo, obrigada por tudo.

Anderson, meu princeso. Chegou faz pouco tempo na minha vida, mas parece que somos amigos de uma vida toda. Muito obrigada por tudo, pela parceria nos experimentos, pela parceria na vida, podes contar comigo pra tudo sempre. Te amo

Volnei, meu amigo ogro preferido. Obrigada por cuidar de mim sempre e me entupir de sushi, por sempre vir com uma frase de incentivo quando eu preciso, me incentivar pra eu não desistir dos meus sonhos. Por entender minha vida corrida e sem tempo, mas né quando precisar de uma companhia pra comprar roupas ou ficar na emergia do Celso Ramos, estamos juntos! Sabes que a gente é família, estou com você e não largo, te amo.

Gilson, meu amor. Obrigada por me aguentar haha (mentira, sou a melhor namorada), eu disse que depois da qualificação ia ser tudo relax, mas né. não foi. Obrigada por estar sempre comigo, por me entupir de comida quando ficava na sua casa escrevendo a tese, por ser meu parceiro de aventuras, por entender minha rotina louca e por escutar todas as minhas explicações bioquímicas sobre exercício físico. Te amo muito e sou muito grata pela vida ter feito a gente se esbarrar.

Queria agradecer também a minha família de coração, por sempre ter me incentivado a estudar e me proporcionar condições melhores de estudo e de vida. Tia Gi, Bel, Zé, Nana, Tio Chico e Vó Ana, muito obrigada por tudo, saibam que eu ter chegado até aqui tem muita contribuição de vocês. Amo vocês.

Wolff, obrigada por tudo, mesmo nos tempos corridos a gente sempre dar um jeito marcar um café e pôr as fofocas em dia, isso significa muito. Te amo. Aos meus amigos SPMPS, muito obrigada por todos os momentos que passamos juntos, por entender meus sumiços, logo volto a ter vida social gente haha Zâ, Cindy Laís, Luiza Marília, Vivi, Pato, Roro, Walter e Yuki, sou muito grata por vcs fazerem parte da minha vida. Amo vocês.

Aos meus sócios Zé, Alex, Barbara, Daniel, obrigada por entenderem minha falta de tempo, nesta etapa final do doutorado.

Aos meus colegas de laboratório e de corredor Aline, minha dupla do team exercise, Dai, Morgana, Vivian, Priscila, Morgana, Filipe (meu oráculo do blotting haha), Maurício e Luis. Muito obrigada pelas dicas nos experimentos, pela parceria e as conversas sobre séries e filmes hehe.

A minha nutricionista preferida Luana, muito obrigada pelas dicas a distância, por discutir coisas bioquímicas aleatórias comigo, por ter me ensinado a fazer blotting, sei que você deve morrer de saudades haha.

Muito obrigada prof Joana, pelos ensinamentos de imunohistoquímica e pela paciência.

Muito obrigada Prof Elisa, por ter me ensinado as técnicas de histologia e por topar se aventurar comigo na morfologia do intestino.

Muito obrigada Livia e professor Oscar, por aceitar parceria e pela ajuda com PCR.

Quero agradecer a todos os técnicos do LAMEB, do LCME, do lab de histologia da graduação. Muito obrigada pela paciência, pelas torcidas em cada revelação de blotting e ensinamentos das técnicas de histologia. Sem vocês minha tese não estaria cheia de técnicas legais.

Obrigada a todos os professores, servidores da UFSC. Obrigada também UFSC por proporcionar toda estrutura para que eu desenvolvesse minha formação desde a graduação. Obrigada a CAPES e ao CNPq pelo fomento da minha pesquisa.

*“É preciso força pra sonhar e
perceber que a estrada vai além do que se vê”*

Marcelo Camelo

*“Você tem um sonho?
E o que te impede de acreditar que você
é realmente do tamanho do seu sonho?”*

Emicida

RESUMO

A doença de Alzheimer (DA) é caracterizada por prejuízos cognitivos progressivos, bem como sintomas não cognitivos, principalmente humor deprimido. O exercício físico tem sido proposto como uma estratégia preventiva contra DA e depressão, um efeito que pode estar relacionado, pelo menos em parte à sua capacidade de prevenir déficits na proliferação e sobrevivência celular neuronal no hipocampo, uma estrutura implicada na cognição e no comportamento afetivo, além de alterações na morfologia intestinal e no eixo intestino-microbiota-cérebro. No Capítulo I desta tese foi investigada a capacidade do exercício físico em esteira (5 dias/semana, 4 semanas) em prevenir o comportamento tipo - depressivo e tipo - ansioso induzido pela administração do peptídeo β amiloide₁₋₄₀ ($A\beta_{1-40}$). Além disso, foi avaliado o efeito do exercício físico e/ou $A\beta_{1-40}$ sobre a via de sinalização intracelular mediada pelo fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF)/proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTOR), bem como a proliferação e a sobrevivência das células hipocâmpais. A administração de $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/camundongo, i.c.v.) aumentou o tempo de imobilidade dos animais e reduziu a latência para imobilidade no teste do nado forçado, o que indica comportamento tipo-depressivo. A administração de $A\beta_{1-40}$ também reduziu o tempo gasto no centro do campo aberto e aumentou o número de episódios de autolimpeza e de bolos fecais, alterações indicativas de comportamento tipo-ansioso. Estas alterações comportamentais foram acompanhadas por uma redução nos níveis de BDNF maduro e fosforilação de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) no hipocampo. A administração de $A\beta_{1-40}$ reduziu a proliferação celular e a sobrevivência nas porções ventral e dorsal do giro denteado. A maioria desses comprometimentos comportamentais, neuroquímicos e morfológicos induzidos por $A\beta_{1-40}$ não foram observados em camundongos previamente submetidos ao exercício físico em esteira. No Capítulo II investigou-se os possíveis efeitos profiláticos do exercício físico sobre o comportamento tipo-depressivo, a morfologia do duodeno, bem como alterações na composição da microbiota induzida pela administração de $A\beta_{1-40}$ em camundongos. A administração de $A\beta_{1-40}$ aumentou o tempo de imobilidade dos camundongos no teste da suspensão pela cauda e reduziu o tempo que os animais cheiraram a urina de fêmeas no TFUF, indicativos de comportamento tipo-depressivo/anedônico. Estas alterações comportamentais foram associadas com diminuição da largura das vilosidades do duodeno. Além disso, fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostraram alterações nas microvilosidades do epitélio duodenal em camundongos sedentários expostos ao $A\beta_{1-40}$, com microvilosidades

mais curtas e com um padrão heterogêneo de comprimento e uma organização desordenada. A administração $A\beta_{1-40}$ também causou uma redução do diâmetro dos grânulos secretórios presentes nas células de Paneth, bem como um maior halo periférico nestas células. Além disso, ocorreu diminuição na abundância do filo Firmicutes, aumento de Bacteroidetes e da relação Bacteroidetes/Firmicutes em camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$. Esses parâmetros comportamentais, morfológicos e alterações na microbiota foram prevenidos pela prática de exercício físico. Os resultados desta tese indicam que o exercício físico tem o potencial de prevenir a ocorrência de comportamento tipo-depressivo e ansioso em um modelo de DA. Este efeito profilático do exercício físico depende, pelo menos em parte, da modulação da via de sinalização BDNF/mTOR no hipocampo, bem como proliferação, sobrevivência celular no giro denteado do hipocampo e na restauração da homeostase intestinal.

Palavras-chave: BDNF; depressão; doença de Alzheimer; eixo intestino-microbiota-cérebro; exercício físico; mTOR; neurogênese; peptídeo β amiloide₁₋₄₀.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by progressive cognitive impairments as well as non-cognitive symptoms such as depressed mood. Physical exercise has been proposed as a preventive strategy against AD and depression. This effect may be related, at least partially, to its ability to prevent impairments on cell proliferation and neuronal survival in the hippocampus, a structure implicated in both cognition and affective behavior. In addition, the beneficial effect of this strategy has been proposed to be related to its ability to counteract intestinal morphological alterations and gut-microbiota-brain dysfunction. In the first chapter of this thesis we investigated the ability of treadmill exercise (5 days/week, 4 weeks) to counteract amyloid β_{1-40} peptide ($A\beta_{1-40}$)-induced depressive-like and anxiety-like behavior in mice. Moreover, we addressed the role of the BDNF/mTOR intracellular signaling pathway as well as hippocampal cell proliferation and survival in the effects of physical exercise and/or $A\beta_{1-40}$. $A\beta_{1-40}$ administration (400 pmol/mouse, i.c.v.) increased immobility time and reduced the latency to immobility in the forced swim test, a finding indicative of depressive-like behavior. In addition, $A\beta_{1-40}$ administration also decreased time spent in the center of the open field and increased grooming and defecation, alterations indicative of anxiety-like behavior. These behavioral alterations were accompanied by a reduction in the levels of mature BDNF and mTOR (Ser²⁴⁴⁸) phosphorylation in the hippocampus. In addition, $A\beta_{1-40}$ administration reduced cell proliferation and survival in the ventral, dorsal and entire dentate gyrus of the hippocampus. Importantly, most of these behavioral, neurochemical and structural impairments induced by $A\beta_{1-40}$ were not observed in mice subjected to 4 weeks of treadmill exercise. In the second chapter we investigated the possible prophylactic effects of physical exercise on the depressive-like behavior, the morphology of the duodenum and alteration on the microbiota composition induced by the administration of $A\beta_{1-40}$ in mice. $A\beta_{1-40}$ administration increased immobility time in the tail suspension test and reduced time spent sniffing in the female urine sniffing test, a result indicative of depressive/anhedonic behavior. These behavioral alterations were accompanied by reduced villus width in the duodenum. Moreover, photomicrographs obtained by transmission electron microscopy revealed abnormal epithelial microvilli in the duodenum from sedentary $A\beta_{1-40}$ -exposed mice, characterized by shorter microvilli and a heterogeneity in the length of these structures that exhibit a disordered packing. Regarding the ultrastructure of Paneth cells, $A\beta_{1-40}$ administration caused a reduction in the secretory granule diameter, as well as an enlarged peripheral halo. These animals also

presented reduced Firmicutes and increased Bacteroidetes abundance, and increased Bacteroidetes/Firmicutes ratio. All these alterations observed in A β ₁₋₄₀-exposed mice were prevented by the practice of physical exercise. Altogether the results of this thesis provide evidence of the prophylactic effect of physical exercise on the occurrence of depressive and anxiety-related behavior in a rodent model of AD. This effect appears to be mediated, at least in part, by modulation of hippocampal BDNF and mTOR signaling as well as through promotion of cell proliferation and survival in the hippocampal DG and in the restoration of unbalanced gut-microbiota-brain axis.

Palavras-chave: Alzheimer disease; amyloid β ₁₋₄₀ peptide; BDNF; depression; gut-microbiota-brain axis; mTOR; neurogenesis; physical exercise.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Vias de sinalização intracelulares estimuladas pelo exercício físico aeróbico	27
Figura 2- Formação de placas senis extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelulares em neurônios	31
Figura 3- Fases da neurogênese no hipocampo adulto	38
Figura 4 - Epitélio duodenal do intestino delgado	41
Figura 5- Liberação de peptídeos antimicrobianos pela célula de Paneth.....	42
Figura 6- Eixo intestino-microbiota-cérebro	45
Figura 7- Linha do tempo experimental	59
Figura 8- Teste do nado forçado.....	61
Figura 9- Teste do campo aberto	62
Figura 10 - Teste de realocação de objeto	63
Figura 11- Efeitos da corrida em esteira no comportamento tipo-depressivo induzido por $A\beta_{1-40}$ no TNF	68
Figura 12- Efeitos da corrida em esteira no comportamento tipo-ansioso induzido por $A\beta_{1-40}$ no TCA	70
Figura 13- Efeitos da exposição $A\beta_{1-40}$ e do exercício físico em esteira na memória espacial dependente do hipocampo na tarefa de realocação do objeto.....	72
Figura 14- Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico em esteira nos níveis de BDNF maduro no soro e no hipocampo	74
Figura 15- Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou protocolo de exercício físico em esteira no imunocontéudo de p-mTOR e mTOR no hipocampo	76
Figura 16- Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou protocolo de corrida em esteira na proliferação de células do hipocampo	79
Figura 17- Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e / ou protocolo de corrida em esteira na sobrevivência de células recém-geradas no hipocampo	83
Figura 18- Representação esquemática dos resultados comportamentais e morfológicos obtidos no Capítulo I	96
Figura 19- Linha do tempo experimental.	100
Figura 20 - Teste de suspensão pela cauda.....	101
Figura 21- Teste do campo aberto	102
Figura 22 - Teste de farejamento da urina da fêmea	103
Figura 23 - Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico em esteira no TSC e no TFUF.....	106
Figura 24 - Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico em esteira sobre parâmetros morfológicos do duodeno	109
Figura 25- Efeito do exercício físico em esteira e/ou da administração de $A\beta_{1-40}$ na morfologia das microvilosidades do duodeno avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão	110
Figura 26 - Efeito do exercício físico em esteira e/ou da administração de $A\beta_{1-40}$ na morfologia das células de Paneth no duodeno avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão	111

Figura 27- Efeito do exercício físico em esteira e / ou da administração de A β 1-40 na abundância de bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes.....	113
Figura 28- Representação esquemática dos resultados comportamentais e morfológicos obtidos no Capítulo II.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo dos resultados obtidos no Capítulo I	95
Tabela 2 - Correlações de Pearson entre diferentes parâmetros avaliados	114
Tabela 3- Resumo dos resultados obtidos no capítulo II.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

4EBP1 - proteína de ligação do fator de iniciação de tradução eucariótica 4E 1

5-HT – serotonina

A β ₁₋₄₀ - peptídeo β -amiloide 1-40

ACTH - fator adrenocorticotrófico

ADP - adenosina 5' difosfato

Akt - proteína cinase B

AMP –adenosina 5' monofosfato

AMPc -3' 5' monofosfato de adenosina cíclico

AMPK - proteína cinase ativada por adenosina monofosfato

β 2AR - receptor β 2A adrenérgico

ATP –adenosina 5' trifosfato

AP – ântero-posterior

BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo

BrdU - 5-bromo-2'-desoxiuridina

CAMKIV - cálcio calmodulina cinase IV

CREB - proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc

CRF - fator liberador de corticotrofina

DA – Doença de Alzheimer

DEPTOR - proteína que interage com mTOR contendo domínio DEP

DV – dorsoventral

EGF – fator de crescimento endotelial

eIF4B - Fator de iniciação de tradução eucariótica 4B

ELISA - ensaio imunoadsorvente ligado à enzima de captura de antígeno

EX - exercitado

GABA - ácido gama-aminobutírico

GD - giro denteado

GDF11 - fator de diferenciação de crescimento 11

GSK3 β - glicogênio sintase cinase 3 β
HPA - eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
i.c.v. - intracerebroventricular
IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
JNK - C Jun N-terminal cinase
LTD - depressão de longa duração
mLST8 - proteína 8 letal em mamíferos com SEC13
ML - mediolateral
mTOR - proteína alvo mecanístico da rapamicina
mTORC1 - complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina
NF- κ B - fator nuclear kappa B
NMDA - N-metil D-Aspartato
OMS – Organização Mundial da Saúde
ONU - Organização das Nações Unidas
p70S6K - Proteína ribossomal S6 cinase β -1
PBS – solução salina fosfato
PFA- paraformaldeído
PI3K - fosfoinositol 3 cinase
PKA - proteína cinase A
APP - proteína precursora amiloide
PRAS40 - substrato de Akt rico em prolina de 40 kDa
RAPTOR - proteína associada a regulação de mTOR
RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa em tempo real
SED - sedentário
Ser - serina
SNC - Sistema nervoso central
TCA - teste do campo aberto
Tel2 - Telômero de manutenção 2
TFUF - teste do farejamento de urina de fêmea
Thr - treonina

TNF - teste do nado forçado

TrkB - Receptor tropomiosina cinase B

TSC - teste de suspensão pela cauda

TSC2 - complexo de esclerose tuberosa 2

tt1 - proteína 1 que interage com Tel2

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

ZSG - zona subgranular

ZSV - zona subventricular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 EXERCÍCIO FÍSICO COMO ESTRATÉGIA DE PREVENÇÃO DE DOENÇAS	23
1.1.2 Exercício físico aeróbico de resistência e vias de sinalização intracelulares	24
1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER	28
1.2.1 Dados epidemiológicos, fisiopatologia e tratamento	28
1.2.2 Comorbidades da DA: depressão	33
1.3 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS COMPARTILHADOS NA DA E NA DEPRESSÃO	34
1.3.1 Plasticidade hipocampal.....	34
1.3.2. Eixo intestino-microbiota-cérebro.....	40
1.4. EXERCÍCIO FÍSICO COMO ESTRATÉGIA NA PREVENÇÃO DA DEPRESSÃO E DA	47
2. JUSTIFICATIVA	52
3. OBJETIVOS	53
3.1 OBJETIVO GERAL	53
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
4 RESULTADOS	54
CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO BDNF E DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA mTOR NO EFEITO PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELO PEPTÍDEO Aβ₁₋₄₀	55
I.1. INTRODUÇÃO	55
I.2. MATERIAIS E MÉTODOS	57
I.2.1. Animais.....	57
I.2.2. Tratamentos	57
I.2.3. Protocolo de Exercício Físico	60
I.2.4. Teste do Nado Forçado (TNF).....	60
I.2.5. Teste de campo aberto (TCA).....	61
I.2.6. Teste de realocação de objeto	62
I.2.7. Níveis de BDNF maduro	63
I.2.8. Imunodeteção de proteínas por Western Blot	64
I.2.9. Processamento de tecido para imuno-histoquímica	65
I.2.10. Quantificação Morfológica	65
I.4. RESULTADOS	66
I.3.1. Efeito do exercício físico em esteira no TNF, TCA e desempenho cognitivo.....	66
I.3.2. Efeito do exercício físico em esteira nos níveis de BDNF e no imunoconteúdo de mTOR.....	72

I.3.3. Efeito do exercício físico em esteira na proliferação e sobrevivência de células do hipocampo	77
I.5 DISCUSSÃO	85
I.6 CONCLUSÃO	94
CAPÍTULO II: EFEITO PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E DISFUNÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL INDUZIDO POR Aβ₁₋₄₀.....	97
II.1 INTRODUÇÃO	97
II.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	98
II.2.1 Animais.....	98
II.2.2 Tratamentos	99
II.2.3 Protocolo de Exercício físico.....	99
II.2.4 Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	100
II.2.5 Teste de campo aberto (TCA)	101
II.2.5 O teste de farejamento da urina da fêmea (TFUF)	102
II.2.6 Coloração com hematoxilina e eosina (H&E)	103
II.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão de células de Paneth e microvilosidades	104
II.4 RESULTADOS	105
II.4.1 Efeito do exercício físico em esteira no TSC e no TFUF.....	105
II.4.2 Efeito do exercício físico em esteira e/ou da administração de A β ₁₋₄₀ em parâmetros morfológicos do duodeno avaliados por coloração de H&E.....	107
II.4.3 Efeito do exercício físico em esteira e/ou da administração de A β ₁₋₄₀ na morfologia das microvilosidades do duodeno avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão.....	110
II.4.4 Efeito do exercício físico em esteira e/ou da administração de A β ₁₋₄₀ na morfologia das células de Paneth no duodeno avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão	111
II.4.5 Efeito do exercício físico em esteira e / ou da administração de A β ₁₋₄₀ na abundância de bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes	112
II.5 DISCUSSÃO	114
II.6 CONCLUSÃO.....	122
5. CONCLUSÃO GERAL	125
6. PERSPECTIVAS.....	126
REFERÊNCIAS	127

APRESENTAÇÃO

Esta Tese de Doutorado está organizada na forma de uma introdução geral, contendo o embasamento teórico, justificativa e objetivos relacionados aos experimentos realizados, seguida por dois capítulos separados. Cada capítulo contém uma breve introdução, objetivos, seus respectivos materiais e métodos, resultados e discussão. Ao final consta uma conclusão geral. As referências bibliográficas estão organizadas em seção única. Os tratamentos, protocolo de exercício físico, avaliações comportamentais, bioquímicas e morfológicas referentes aos dois capítulos foram conduzidos no Laboratório de Neurobiologia da Depressão, exceto RT-qPCR que foram realizadas no Laboratório de Imunologia Aplicada. As avaliações das imagens referentes aos estudos morfológicos foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB- UFSC).

PUBLICAÇÃO QUE FAZ PARTE DESTA TESE DE DOUTORADO

ROSA, J. M.; PAZINI, F.L.; OLESCOWICZ, G.; CAMARGO, A.; MORETTI, M.; GIL-MOHAPEL, J; RODRIGUES, A. L. S. Prophylactic effect of physical exercise on A β ₁₋₄₀-induced depressive-like behavior: Role of BDNF, mTOR signaling, cell proliferation and survival in the hippocampus. PROGRESS IN NEURO-PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY, 2019.

PUBLICAÇÕES EM COLABORAÇÃO DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

CUNHA, M. P.; BUDNI, J.; LUDKA, F. K.; PAZINI, F. L.; **ROSA, J. M.**; OLIVEIRA, A.; LOPES, M. W.; TASCA, C. I.; LEAL, R. B.; RODRIGUES, A.L. Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway and Its Downstream Intracellular Targets in the Antidepressant-Like Effect of Creatine. MOLECULAR NEUROBIOLOGY, v. 53, p. 2954-2968, 2016.

PAZINI, F. L.; CUNHA, M. P.; AZEVEDO, D.; **ROSA, J. M.**; COLLA, A.; DE OLIVEIRA, J.; RAMOS-HRYB, A.B.; BROCARDI, P. S.; GIL-MOHAPEL, J.; RODRIGUES, A.L.S. Creatine Prevents Corticosterone-Induced Reduction in Hippocampal Proliferation and Differentiation: Possible Implication for Its Antidepressant Effect. MOLECULAR NEUROBIOLOGY, v. 54, p. 6245-6260, 2016.

CUNHA, M. P.; PAZINI, F. L.; LIEBERKNECHT, V.; BUDNI, J.; OLIVEIRA, A.; **ROSA, J.M.** ; MANCINI, G.; MAZZARDO, L.; COLLA, A. R.; LEITE, M. C.; SANTOS, A.R.S. ; MARTINS, D. F. ; DE BEM, A. F.; GONÇALVES, C. A. S. ; FARINA, M.; RODRIGUES, A. L. S. . MPP+-Lesioned Mice: an Experimental Model of Motor, Emotional, Memory/Learning, and Striatal Neurochemical Dysfunctions. MOLECULAR NEUROBIOLOGY, v. 54, p. 6356-6377, 2016.

PAZINI, F. L.; CUNHA, M.P.; **ROSA, J. M.**; COLLA, A. R. S.; LIEBERKNECHT, V.; OLIVEIRA, A.; RODRIGUES, A.L.S. Creatine, Similar to Ketamine, Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. MOLECULAR NEUROBIOLOGY, v. 53, p. 6818-6834, 2016.

MANOSSO, L. M.; MORETTI, M.; **ROSA, J. M.**; CUNHA, M. P.; RODRIGUES, A. L. S. Evidence for the involvement of heme oxygenase-1 in the antidepressant-like effect of zinc. *Pharmacological Reports*, v. 69, p. 497-503, 2017.

ROSA, J. M.; PAZINI, F. L.; CUNHA, M. P.; COLLA, A. R.S.; MANOSSO, L. M.; MANCINI, G.; SOUZA, A.C.G.; DE BEM, A. F.; PREDIGER, R. D.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant effects of creatine on amyloid β 1-40 -treated mice: The role of GSK-3 β /Nrf 2 pathway. *PROGRESS IN NEURO PSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY*, v. 86, p. 270-278, 2018.

DA FONSÊCA, V. S.; DA SILVA COLLA, A. R.; DE PAULA NASCIMENTO-CASTRO, C.; PLÁCIDO, E.; **ROSA, J. M.**; FARINA, M.; GIL-MOHAPEL, J; RODRIGUES, A. L. S.; BROCARD, P. S. Brain-Derived Neurotrophic Factor Prevents Depressive-Like Behaviors in Early-Symptomatic YAC128 Huntington's Disease Mice. *MOLECULAR NEUROBIOLOGY*, v. 55, p. 7201-7215, 2018.

CAMARGO, A; PAZINI, F. L.; **ROSA, J. M.**; WOLIN, I.A.V.; MORETTI, M.; ROSA, P.B.; NEIS, V. B.; RODRIGUES, A. L. S. Augmentation effect of ketamine by guanosine in the novelty-suppressed feeding test is dependent on mTOR signaling pathway. *JOURNAL OF PSYCHIATRIC RESEARCH*, p. 103-112, 2019.

1 INTRODUÇÃO

1.1 EXERCÍCIO FÍSICO COMO ESTRATÉGIA DE PREVENÇÃO DE DOENÇAS

O sedentarismo é um desafio para saúde, causando grande custo financeiro no mundo. Globalmente, o sedentarismo custa cerca de 54 bilhões de dólares em assistência médica direta, sendo que desse valor 57% está atribuído ao setor público. Além disso, calcula-se uma perda econômica de outros 14 bilhões de dólares, que são atribuídos a quedas de produtividade associada ao sedentarismo (WHO, 2010). Estudos estimam que adultos gastem em média 5% do seu tempo no dia em algum treinamento físico ou atividade física de moderada a vigorosa, sendo o restante do tempo gasto em atividade física de leve intensidade ou comportamento sedentário (atividades que não aumentam os gastos energéticos acima do nível de repouso – equivalentes metabólicos iguais ou menores a 1,5) (Healy *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012; Mielke *et al.*, 2014). O comportamento sedentário pode ser mensurado como o tempo total que o indivíduo gasta por dia sentado em atividades como assistir televisão, utilizar computador, como também tempo que passa sentado na escola, trabalho, transporte público, carro ou moto (Mielke *et al.*, 2014). Estudos recentes avaliaram que comportamentos sedentários trazem consequências negativas para a saúde, mostrando associações com a mortalidade por diversas causas como doenças cardiovasculares, câncer (Katzmarzyk *et al.*, 2009), diabetes (Ford *et al.*, 2010), risco de obesidade (Meyer *et al.*, 2008). Além disso, há uma relação entre o comportamento sedentário com declínio cognitivo (Wheeler *et al.*, 2017) e transtornos de humor (Zhai *et al.*, 2015; Schuch *et al.*, 2017; Stubbs *et al.*, 2018).

A prática regular de exercício físico traz benefícios comprovados à saúde na prevenção e como co-adjuvante no tratamento de doenças não transmissíveis como doenças cardíacas (Cattadori *et al.*, 2018), diabetes (Chipkin *et al.*, 2001), câncer (Hojman *et al.*, 2018), além de transtornos psiquiátricos (Stanton e Reaburn, 2014) e doenças neurodegenerativas (Liu *et al.*, 2019). Além disso, o exercício físico auxilia na prevenção da hipertensão, excesso de peso e obesidade, contribuindo também para a melhora em doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC), trazendo benefícios na qualidade de vida e bem-estar aos indivíduos (WHO, 2010). Visto que no mundo cerca de 20% dos adultos e de 80% dos adolescentes não praticam exercícios físicos com frequência e intensidade adequadas para sua faixa etária, a Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2018 lançou um plano de ação mundial sobre atividade física e saúde para 2018 a

2030, chamado: “Sejamos ativos: todos, em todos os lugares, todos os dias” (tradução livre para o português de *Let's Be Active: Everyone, Everywhere, Everyday*). Este plano teve como objetivo incentivar as pessoas a serem mais ativas para um mundo mais saudável, contribuindo para a prevenção e controle de doenças crônicas não transmissíveis (WHO, 2018).

Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU) é recomendado que crianças e adolescentes de 5 a 17 anos pratiquem pelo menos 60 minutos diários de atividade física (moderada a intensa), pelo menos 3 vezes na semana. A recomendação para adultos é que a prática de atividade física moderada deve chegar a no mínimo 150 minutos ao longo da semana, mas em caso de atividade física intensa 75 minutos semanais já seriam suficientes. Entre as recomendações está que atividades para fortalecimento muscular devem ser realizadas em dois ou mais dias da semana, com objetivo de contemplar grandes grupos musculares (WHO, 2013; WHO, 2018).

O exercício físico é definido como uma atividade física planejada, estruturada, planejada e repetitiva, que tenha como objetivo a melhora ou manutenção da saúde física ou mental (Dishman *et al.*, 2006). Na literatura são descritos alguns tipos de exercício físico, sendo eles o anaeróbico, de flexibilidade e o aeróbico. O exercício físico anaeróbico trabalha diversos grupos musculares durante um determinado e constante período de tempo, de forma contínua (Medbo *et al.*, 1988). Esse tipo de exercício físico contribui para uma entrega de oxigênio mais rápida por todo corpo, apresentando melhora significativa no funcionamento do sistema cardiovascular e pulmões, como exemplo deste tipo de exercício temos a musculação (Patel *et al.*, 2017). O exercício físico de flexibilidade está relacionado à capacidade dos tecidos corporais de se esticarem sem danos ou lesões e com ampla movimentação em um ou mais grupos de articulações, como por exemplo, o alongamento (Galloza *et al.*, 2017). Já o exercício físico aeróbico usa oxigênio no processo de geração de energia dos músculos, no qual o processo de fosforilação oxidativa supre predominantemente a energia necessária do músculo esquelético em atividade. Esse tipo de exercício físico trabalha uma grande quantidade de grupos musculares de forma rítmica, tendo como exemplos, correr, nadar e pedalar (Hillman *et al.*, 2008).

1.1.2 Exercício físico aeróbico de resistência e vias de sinalização intracelulares

Dentre os tipos de treinos de exercício físico aeróbico, este trabalho aborda o exercício físico aeróbico de resistência. Essa modalidade de exercício físico é caracterizada por

contrações musculares repetitivas, sustentadas e de baixa intensidade por um período prolongado. O exercício físico aeróbico de resistência envolve atividades moderadas a vigorosas, que resultam em uma frequência cardíaca elevada por um longo período (Dishman, 2006; Farrell *et al.*, 2018).

Tem-se postulado que o músculo esquelético possa ser um importante órgão endócrino, pois quando este tecido é estimulado (por exemplo, pelo exercício físico), sintetiza importantes fatores (miocinas) que modulam a neuroplasticidade (Wrann *et al.*, 2013). A contração muscular no exercício físico aeróbico de resistência estimula a transcrição do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). O aumento dessa transcrição ocorre via ativação de proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), podendo ocorrer de três maneiras distintas no miócito (célula do tecido muscular): 1) ativação de receptores beta adrenérgicos do tipo 2A, acarretando um aumento na concentração intracelular do 5'-monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), desencadeando a ativação da proteína cinase A (PKA); 2) aumento do influxo de cálcio que culmina na ativação da proteína cálcio calmodulina cinase IV (CAMKIV); 3) aumento da razão AMP/ATP, podendo levar a fosforilação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK) (Maekawa *et al.*, 2018; Walsh e Tschakovsky, 2018).

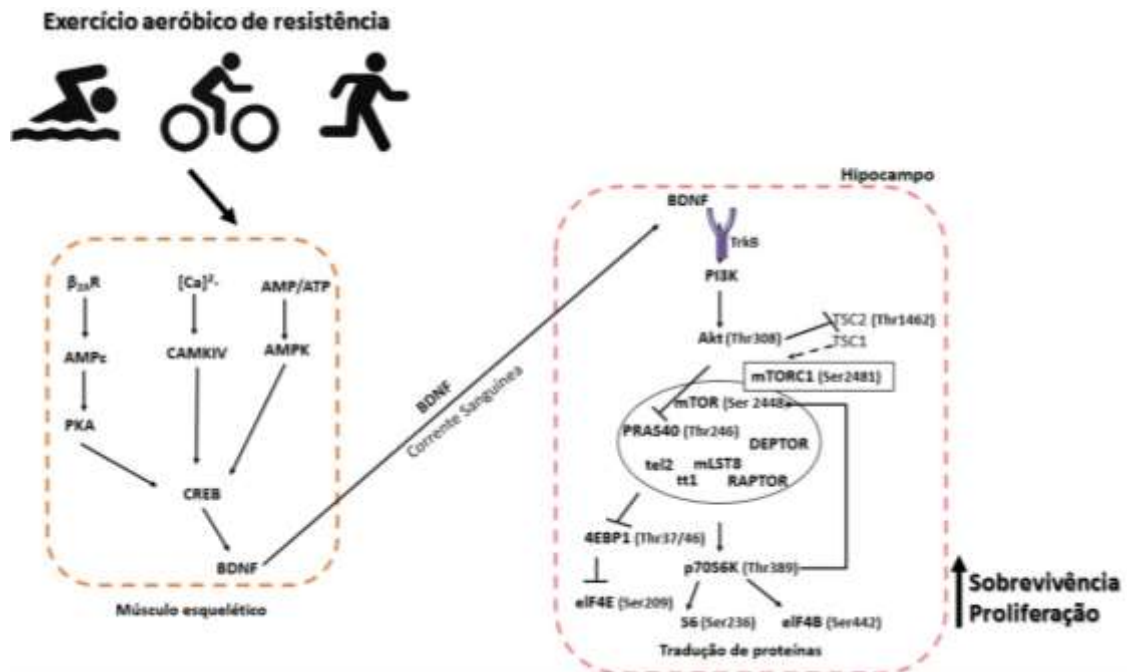
Em humanos, o BDNF é traduzido como uma pré-proteína constituída de um pré-pró-domínio, um pró-domínio e uma forma madura C terminal, contendo 247 resíduos de aminoácidos. O pré-pró-domínio contendo o peptídeo sinal (18 primeiros resíduos de aminoácidos) é transportado em vesículas para o retículo endoplasmático. A forma longa dessa proteína (sem os 18 primeiros resíduos de aminoácidos) pode ser clivada em duas regiões. Uma sequência de clivagens pode originar uma forma curta de pró-BDNF e forma madura de BDNF (BDNFm), contendo 119 resíduos de aminoácidos (Pang e Lu, 2004; Pang *et al.*, 2006; Je *et al.*, 2012). As duas formas dessa neurotrofina exercem atividades distintas no organismo. O pró-BDNF se liga com alta afinidade no pan-receptor de neurotrofina (p75NTR), que culmina na ativação de vias de sinalização associadas com a retração dos dendritos, depressão de longa duração (LTD) e apoptose. O BDNFm proveniente da contração muscular pode atuar no músculo ou ser liberado para a corrente sanguínea e atuar em outros órgãos, como o encéfalo e o intestino (Pan *et al.*, 1998).

Nesses tecidos o BDNF pode se ligar no receptor tropomiosina cinase B (TrkB), ativando a proteína fosfoinositol 3 cinase (PI3K), que por sua vez fosforila a proteína

cinase B (Akt) no resíduo de treonina 308, tornando-a ativa. A Akt fosforila e inibe o complexo de esclerose tuberosa 2 (TSC 2) no resíduo de treonina 1462 e o substrato de Akt rico em prolina de 40 kDa (PRAS40) no resíduo de treonina 246, que quando ativada exerce atividade inibitória do complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTORC1). O mTORC1 se autofosforila no resíduo de serina 2481, fosforilando e ativando a proteína ribossômica S6 cinase beta (p70S6K), que por sua vez fosforila a proteína ribossomal S6 no resíduo de serina 236 e o fator de iniciação de tradução eucariótica 4B, no resíduo de serina 442. A p70S6K também fosforila a mTOR no resíduo de serina 2448, proteína presente no complexo mTORC1, fazendo com que ela se torne ativa, culminando em um *looping* de ativação entre a mTOR e a p70S6K. Além disso, o complexo mTORC1 também fosforila a proteína 1 de ligação ao fator de iniciação da tradução eucariótica (4eBP1), no resíduo de treonina 37/46 e o fator de iniciação de tradução eucariótica 4E, no resíduo de serina 209, tornando essas duas proteínas inativas. Como resultado dessa cascata de fosforilação ocorre um aumento na proliferação e sobrevivência celular (Wrann *et al.*, 2013; Chen, *et al.*, 2015). **(Figura 1)**. O BDNFm também pode se ligar ao receptor p75NTR, com baixa afinidade. Essa interação pode ativar vias de sinalização que culminam em apoptose ou sobrevivência, através da cascata de reações ativada por C Jun N-terminal cinase (JNK) ou pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B), respectivamente (Cunha *et al.*, 2010).

O aumento do BDNF no hipocampo também pode ser decorrente do aumento da concentração de irisina liberado pelo músculo em condições de exercício físico. No músculo, o coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PGC-1 α), uma proteína da classe de reguladores da transcrição, pode controlar programas de respostas gênicas. Há um aumento da expressão de PGC-1 α quando há uma necessidade de aumento energético, como durante o treinamento físico (Schnyder e Handschin, 2015). O PGC-1 α rege a transcrição de fibronectina tipo III contendo domínio 5 (FNDC5) no músculo, que ao ser clivada origina a irisina. Esta se difunde na corrente sanguínea e pode chegar a outros tecidos, incluindo o encéfalo, onde pode culminar com a transcrição hipocampal de BDNF (Wrann *et al.*, 2013).

Figura 1- Vias de sinalização intracelulares estimuladas pelo exercício físico aeróbico



Legenda: Com a prática crônica do exercício físico aeróbico ocorre formação de BDNF via CREB no músculo. Essa formação pode ocorrer de três formas: a) aumento de AMPc e ativação da PKA; b) aumento de cálcio e ativação da enzima CAMKIV e c) o aumento da razão AMP/ATP que pode favorecer da enzima AMPK. O BDNF é liberado na corrente sanguínea e distribuído por vários tecidos como encéfalo. O BDNF pode se ligar ao seu receptor TrkB e ativar uma cascata de sinalização que culmina na ativação do complexo mTORC1 (formado pelas proteínas mTOR, PRAS40, DEPTOR, RAPTOR, tel2, mLST8 e tt1). Após a ligação do BDNF no seu receptor, ocorre ativação da PI3K, que fosforila a AKT, a qual por sua vez fosforila e inibe as proteínas PRAS40 (Thr²⁴⁶) e a proteína TSC2(Thr¹⁴⁶²) inibidoras da mTORC1. Conseqüentemente, o mTORC1 se autofosforila (Ser²⁴⁸¹), tornando-se ativo. Na sequência, fosforila as proteínas 4EBP1 (Thr^{37/46}) e a p70S6K (Thr³⁸⁹). A p70S6K fosforila a mTOR (Ser²⁴⁴⁸), mantendo um *loop* de ativação que favorece o aumento da sobrevivência e proliferação neuronal. 4EBP1, proteína de ligação do fator de iniciação de tradução eucariótica 4E 1; ADP, adenosina monofosfato; Akt, proteína cinase B; AMP, adenosina monofosfato; AMPc, 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico; AMPK, proteína cinase ativada por adenosina monofosfato; ATP, adenosina trifosfato; BDNF, fator neurotrófico derivado do encéfalo; CAMKIV, cálcio-calmodulina cinase IV; CREB, proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc ; DEPTOR, proteína que interage com mTOR contendo domínio DEP; eIF4B, Fator de iniciação de tradução eucariótica 4B; eIF4E, proteína eucariótica fator de tradução 4B; mLST8, proteína 8 mamífero letal SEC13; mTOR, proteína alvo mecanístico da rapamicina; mTORC1, complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina; p70S6K, Proteína ribossomal S6 cinase β-1; PI3K, fosfoinositol 3 fosfato cinase; PKA, proteína cinase A; PRAS40, substrato de Akt rico em prolina de 40 kDa; RAPTOR, proteína associada a regulação de mTOR; Ser, serina; Tel2, telômero de manutenção 2; Thr, treonina; TrkB, receptor tropomiosina cinase B; tt1, proteína 1 que interage com Tel2; β2AR, receptor β2A adrenérgico. Fonte: do autor.

O BDNF é uma neurotrofina essencial para a plasticidade neural e sináptica em todo SNC, por culminar na ativação de vias de sinalização que favorecem o crescimento, sobrevivência e diferenciação de neurônios (Song et al., 2017). A redução desta neurotrofina em regiões encefálicas, particularmente no hipocampo e córtex, é comum em diversas patologias, como DA (Giuffrida et al., 2018) e depressão. Essa redução pode contribuir para a diminuição de volume do hipocampo e do córtex pré-frontal (Gray et al., 2013). Essas modificações em consequência da redução do conteúdo de BDNF encefálico podem estar relacionadas com sintomas que ocorrem nessas doenças como déficits cognitivos, humor deprimido e anedonia (Zhang et al., 2016; Lu et al., 2014).

1.2 DOENÇA DE ALZHEIMER

1.2.1 Dados epidemiológicos, fisiopatologia e tratamento

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que constitui a causa mais comum de demência no mundo, tendo a idade como principal fator de risco. Esta doença se caracteriza por uma degeneração progressiva de regiões específicas do SNC, incluindo córtex cerebral, estriado e hipocampo, tendo como consequência mudanças comportamentais, déficits de memória e outros prejuízos cognitivos, que tendem a se agravar com a progressão da doença (Glennner e Wong, 2012; Lane, *et al.*, 2018). O comprometimento cognitivo progressivo é suficiente para causar um impacto negativo nas atividades da vida diária (Lane, *et al.*, 2018; Trevisan *et al.*, 2019).

Além dos déficits cognitivos presentes nos indivíduos acometidos pela DA, é comum a ocorrência de sintomas psiquiátricos: irritabilidade, depressão, mudanças de comportamento noturno, ansiedade, alterações do apetite, agitação ou apatia, elação (arrogância), distúrbios motores, alucinações, delírios e desinibição comportamental (Masters *et al.*, 2015; Lanctot *et al.*, 2017). Esta doença se constitui em uma crescente preocupação global de saúde, com enormes implicações para os indivíduos e para a sociedade.

A prevalência da DA está aumentando acentuadamente devido à expectativa de vida prolongada e ao envelhecimento da população (Fiest *et al.*, 2016). Estima-se que existam 46,8 milhões de indivíduos afetados com DA no mundo e que esse número possa triplicar até 2050 (Guzman-Martinez *et al.*, 2019). Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (2018), estima-se que exista no Brasil cerca de 1,2 milhões de casos, a maior parte deles ainda sem diagnóstico. A incidência de DA é diferente de acordo com sexo,

após 80 anos incidência é notavelmente maior em mulheres do que em homens, antes dos 80 anos é modestamente maior em homens do que mulheres ou não difere entre homens e mulheres (Ott *et al.*, 1998; Knopman *et al.*, 2014; Snyder *et al.*, 2016). Um estudo da Clínica Mayo de pesquisa em envelhecimento também relatou que a taxa de progressão de transtorno cognitivo leve para DA foi maior em homens em comparação com mulheres de 70 a 79 anos, mas maior em mulheres que em homens após 80 anos (Roberts *et al.*, 2012). Estima-se que 47 milhões de pessoas tenham demência e que aproximadamente 70% dos casos sejam DA (Reitz *et al.*, 2011).

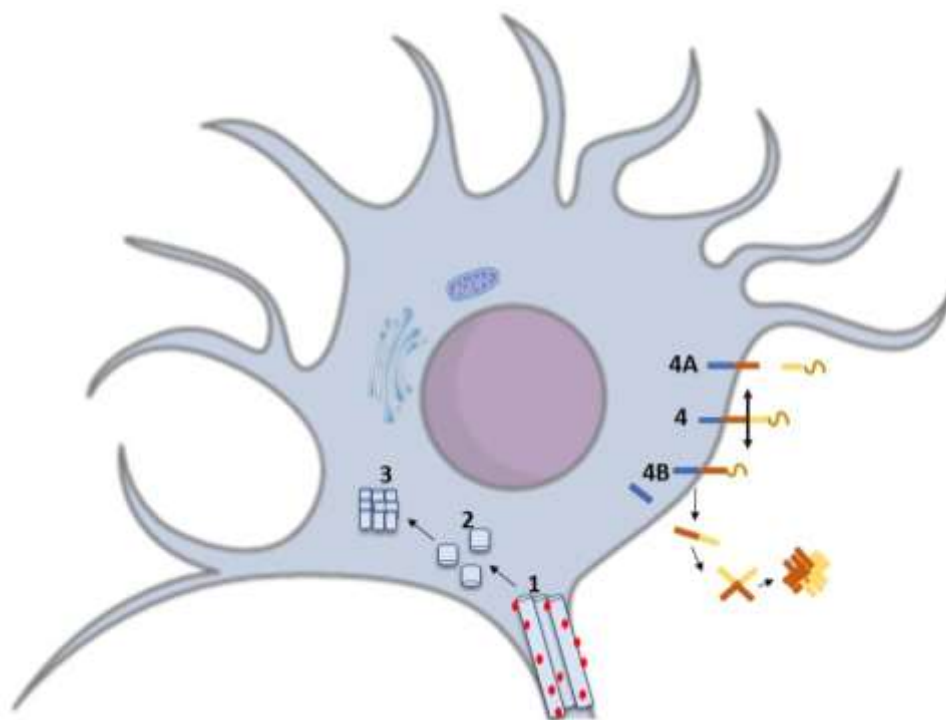
A DA pode ser classificada de acordo com sua etiologia, podendo ser relacionada a fatores genéticos familiares (forma familiar), ou independente destes fatores (forma esporádica). A DA familiar geralmente apresenta um início precoce e pode ser causada pela mutação de alguns genes como APP (do inglês, *amyloid precursor protein*), presenilina 1 e 2, juntamente com outros genes, como o receptor desencadeante expresso nas células mielóides 2 (TREM2), os transportadores de cassete de ligação a ATP 1 e 7 (ABCA1 e ABCA7) e γ -secretases (Sorbi *et al.*, 2001; Tanzi e Bertram, 2005). Por outro lado, a DA esporádica apresenta início dos sintomas mais tardio e pode se desenvolver em decorrência de alterações a nível molecular, como metilação e dano oxidativo em certos genes, além da ausência de sistemas de reparo eficientes em um organismo em processo de envelhecimento (Dorszewska *et al.*, 2016). No entanto, ambas as formas de DA apresentam tipos similares de manifestações moleculares e neuropatológicas, como comprometimento das vias de sinalização relacionadas ao receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA), acúmulo intracelular de proteína tau hiperfosforilada, deposição extracelular de peptídeo β - amiloide (A β), estresse oxidativo, distúrbios do metabolismo de íons metálicos, anormalidades do metabolismo lipídico e distúrbios na estrutura e funções mitocondriais (Cappa, 2018; Hampel, O'bryant, *et al.*, 2018).

Duas hipóteses principais tentam elucidar a etiologia da DA, a hipótese amiloide e a colinérgica. A hipótese amiloide sugere que o acúmulo de formas patológicas de A β produzidos pela clivagem sequencial da proteína precursora amiloide (APP) pelas enzimas β e γ -secretase no encéfalo caracteriza o processo primário (Li *et al.*, 2018). Esses peptídeos podem ser encontrados na forma de monômeros, se agregam na forma de oligômeros, fibrilas e placas senis (**Figura 2**) (Hardy e Selkoe, 2002; Selkoe e Hardy, 2016). Esse acúmulo de A β é causado por um desequilíbrio entre a produção e a liberação deste peptídeo. A formação destas placas ocorre devido ao acúmulo no espaço

extracelular de $A\beta$, seja por aumento da sua produção ou diminuição da sua degradação ou ainda, pela redução de sua depuração na barreira hematoencefálica (Glennner e Wong, 2012).

Outra característica fisiopatológica da DA são os emaranhados neurofibrilares presentes no espaço intracelular. Estes são formados pelo acúmulo da proteína tau associada aos microtúbulos hiperfosforilada (**Figura 2**). Esses emaranhados podem ser resultado do excesso de $A\beta$, da mobilização da microglia, liberação de citocinas pró-inflamatórias, desregulação do cálcio neural ou hiperativação de cinases, como a glicogênio sintase cinase 3β (GSK3 β). Particularmente, após a hiperfosforilação da proteína tau, esta proteína dissocia-se dos microtúbulos, agregando-se sob a forma de filamentos helicoidais pareados insolúveis, formando os emaranhados neurofibrilares (Palop e Mucke, 2010; Sakono e Zako, 2010).

Figura 2- Formação de placas senis extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelulares em neurônios



Legenda: Quando ocorre a hiperfosforilação da proteína tau (representado pelos pontos vermelhos) (1) a proteína se dissocia dos microtúbulos (2) e se agrega sob a forma de filamentos helicoidais pareados insolúveis (3), formando os emaranhados neurofibrilares no espaço intracelular. A APP (4) é uma proteína integral de membrana que pode ser clivada pela α -secretase (4A), formando peptídeos solúveis que são degradados ou pela enzima β -secretase (4), e em seguida pela γ -secretase (4B, formando o $A\beta$ ($A\beta_{1-40}$ e/ou $A\beta_{1-42}$). Este peptídeo pode então se agregar a outros fragmentos de peptídeos $A\beta$ e formar oligômeros, fibrilas e por fim a placa β -amiloide, na parte extracelular. PPA, proteína precursora amiloide. Fonte: do autor.

A segunda hipótese que tenta elucidar a fisiopatologia da DA, que complementa a anterior é a hipótese colinérgica, que postula que a perda seletiva dos neurônios colinérgicos em regiões do encéfalo resulta na diminuição de acetilcolina em regiões responsáveis pela memória e aprendizado. O sistema colinérgico é um dos sistemas responsáveis pelas funções cognitivas, incluindo memória, raciocínio, desempenho de tarefas e aprendizagem (Ferreira-Vieira *et al.*, 2016).

Os principais fármacos para tratamento de DA são os inibidores da enzima acetilcolinesterase (tacrina, fisostigmina, donepezil, rivastigmina e galantamina). Esses

fármacos proporcionam uma maior oferta de acetilcolina na fenda sináptica, por inibir a hidrólise (degradação) da acetilcolina. Esses medicamentos usados na farmacoterapia da DA são paliativos, uma vez que são efetivos em amenizar os déficits cognitivos, porém não reduzem a progressão da doença (Schneider, 2013; Hampel, Mesulam, *et al.*, 2018).

Uma estimulação excessiva do sistema glutamatérgico também pode ocorrer em regiões encefálicas de indivíduos com DA (Wang *et al.*, 2017). O sistema de captação e reciclagem de glutamato é um fator importante que determina a disponibilidade de glutamato para processos de sinalização. Na DA, esse sistema pode estar comprometido, podendo contribuir para a excitotoxicidade e a neurodegeneração associadas a esta doença. Há evidências de que ocorre ativação de receptores NMDA extra-sinápticos, os quais promovem morte neuronal e contribuem para os sintomas da DA (Wang e Reddy, 2017). Desta forma, a memantina, um antagonista de receptor NMDA, pode ser utilizada para casos moderados da DA (Anand *et al.*, 2017; Folch *et al.*, 2018).

A farmacoterapia da DA ainda apresenta uma série de limitações, por não ser efetiva em tratar as causas subjacentes da DA, não sendo capaz de interromper seu desenvolvimento (Anand *et al.*, 2017; Epperly *et al.*, 2017). Em vista disso, atualmente os estudos direcionados para obtenção de novas estratégias para prevenção e tratamento da doença estão focando em múltiplos alvos terapêuticos, incluindo a depuração de A β , depósitos de proteína tau, apolipoproteína-E, neuroproteção e neuroinflamação, bem como a estimulação cognitiva (Salomone *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2018). Além da tentativa de tratamento, também existe a necessidade de estratégias de prevenção para a DA através de modificações no estilo de vida e gerenciamento de fatores de risco, incluindo intervenções não farmacológicas, como dieta e prática de exercício físico (Cao *et al.*, 2018). É comum que indivíduos que têm DA, apresentem alguma outra condição patológica, por serem indivíduos idosos. Dentre as comorbidades é possível citar o diabetes mellitus, transtornos de humor, ansiedade, hipertensão, entre outros. Por ser uma doença sem tratamento efetivo em promover a cura, estratégias de prevenção que englobem uma melhora nos mecanismos presentes na DA e comorbidade são necessárias, devido a expectativa de aumento da prevalência de doenças neurodegenerativas na população mundial (Haaksma *et al.*, 2017). Dentre as comorbidades, de especial interesse é a ocorrência de depressão e ansiedade nos pacientes portadores de DA devido a sua alta prevalência e prejuízo na qualidade de vida destes indivíduos (Novais *et al.*, 2015). Este tópico será destacado a seguir.

1.2.2 Comorbidades da DA: depressão

Comorbidade é a existência de duas ou mais doenças simultaneamente no mesmo indivíduo. Essas doenças estão etiologicamente relacionadas, sendo comum o compartilhamento de alguns mecanismos de ação. A depressão é um transtorno psiquiátrico comum em pacientes com DA que apresentam disfunção na plasticidade neuronal e no eixo intestino-microbiota-cérebro (Liang et al., 2018).

A depressão é o transtorno psiquiátrico mais prevalente em pacientes com DA, acometendo cerca de 50% dos indivíduos. A depressão é um transtorno de humor crônico e recorrente, que acarreta considerável perda de produtividade, qualidade de vida, comprometimento no relacionamento social, diminuição da capacidade de viver de forma independente (Galts et al., 2019). A comorbidade entre a DA e a depressão aumenta o risco de institucionalização e resulta na sobrecarga do cuidador e o risco de mortalidade (Novais e Starkstein, 2015; Zhao *et al.*, 2016).

Somente no final do século XX, a depressão foi reconhecida como uma comorbidade frequente da DA, que ocorre especialmente nos estágios iniciais da doença, levando a concluir que a depressão pode preceder as alterações cognitivas presentes nas demências (Ebert e Bar, 2010; Novais e Starkstein, 2015). Atualmente a depressão na DA é subdiagnosticada, o que pode ser explicado pela escassez de instrumentos projetados especificamente para avaliar a depressão na demência. Isso ocorre devido à baixa consistência no uso de critérios para diagnósticos, viés nos relatos dos pacientes e cuidadores, bem como dificuldade em distinguir os sintomas de depressão nesses pacientes (Byers e Yaffe, 2011; Barnes *et al.*, 2012).

Fatores presentes na depressão podem dificultar o diagnóstico dessa comorbidade. Um deles é a anosognosia, que é um estado neurológico caracterizado pela incapacidade de o indivíduo estar consciente da sua própria doença (Novais e Starkstein, 2015). Estudos mostram que quanto mais grave é o estágio de DA, maior anosognosia é observada (Migliorelli *et al.*, 1995). Além disso, a apatia e a ansiedade são as condições de comorbidades mais frequentes na depressão em indivíduos com DA. A apatia dificulta o diagnóstico da depressão nesses pacientes, dado que a perda de interesse e motivação são critérios críticos para ambas as condições. Sintomas somáticos como o retardo psicomotor, a perda de energia e a hipersônia são relatos comuns na apatia e na depressão.

Para diferenciar esse quadro é necessária uma avaliação clínica cuidadosa com base nos sintomas adicionais, como humor deprimido, sentimento de culpa, baixa autoestima e desesperança, todos mais frequentes na depressão do que na apatia (Starkstein *et al.*, 2011).

Alguns aspectos neurobiológicos podem explicar a elevada comorbidade existente entre DA e depressão. A depressão pode ser um fator de risco ou uma condição que predispõe à DA (Chi *et al.*, 2014), pois fatores presentes na depressão como redução de monoaminas, atrofia do hipocampo, neuroinflamação e estresse oxidativo no SNC, baixas concentrações de BDNF, disfunção do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), com níveis de cortisol elevados podem contribuir para a ocorrência da DA, além de uma disfunção no eixo intestino-microbiota-cérebro (Krishnan e Nestler, 2008).

1.3 MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS COMPARTILHADOS NA DA E NA DEPRESSÃO

Alguns mecanismos fisiopatológicos parecem ser comuns no desenvolvimento da DA e da depressão. Entre estes destaca-se o prejuízo na plasticidade hipocampal e alterações no eixo intestino-microbiota-cérebro, os quais serão abordados a seguir.

1.3.1 Plasticidade hipocampal

Estudos em roedores e humanos mostraram que o hipocampo é uma estrutura heterogênea com diferenças funcionais gradualmente segregadas ao longo do seu eixo dorso-ventral (Kjelstrup *et al.*, 2008). Em roedores, estudos de lesões no hipocampo têm sido usados para examinar as funções diferenciais dos polos do hipocampo dorsal e ventral (Fanselow e Dong, 2010; Papatheodoropoulos, 2018). Esses estudos mostraram que as lesões no hipocampo dorsal prejudicam principalmente a cognição e a aprendizagem espacial. Já a inibição optogenética das células granulares do GD dorsal demonstrou um prejuízo na codificação da memória contextual (tipo de memória responsável pela capacidade de discernir a origem de uma memória específica) (Kheirbek *et al.*, 2013). Em humanos, o hipocampo posterior, análogo ao hipocampo dorsal em roedores, é maior em indivíduos que necessitam de grande capacidade de processamento de informações espaciais e contextuais como, por exemplo, motoristas (Maguire *et al.*, 2000; Maguire *et al.*, 2003). Além disso, foi encontrada alta atividade no hipocampo

posterior em primatas não humanos após aprendizagem espacial (Colombo e Gallagher, 1998; Inoue *et al.*, 2004).

Por outro lado, lesões do hipocampo ventral indicam que esta estrutura está relacionada com comportamento emocional, interações sociais (Felix-Ortiz e Tye, 2014) e resiliência ao estresse (Moser *et al.*, 1993). Foi demonstrado em roedores, que a ativação optogenética das células granulares do giro denteado (GD) ventral diminui o comportamento inato de ansiedade (Kheirbek *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2017). O hipocampo anterior humano é análogo ao hipocampo ventral em roedores. Estudos relatam que hipocampo anterior é menor em pacientes com depressão não medicados, e maior em pacientes tratados com antidepressivos, quando comparado com indivíduos saudáveis (Boldrini *et al.*, 2013). Em primatas não humanos o aumento do comportamento tipo-ansioso e atividade neuroendócrina também está relacionada a um aumento do metabolismo do hipocampo anterior (Shackman *et al.*, 2013).

Diferenças dorso-ventrais também são observadas em relação à neurogênese. Especificamente, em roedores o número de células adultas que expressam doublecortina (DCX, marcador de neurônios imaturos) é maior no GD dorsal do que no ventral (Jinno, 2011). Porém, o número de neurônios maduros adultos é maior no GD ventral do que no dorsal, sugerindo que no geral, mais neurônios podem ser adicionados ao GD ventral (Tanti *et al.*, 2013). De acordo com a segregação funcional entre o hipocampo dorsal e ventral, a neurogênese dorsal é aumentada em roedores que sofrem estimulação especial e contextual complexa em ambiente enriquecido (Kempermann *et al.*, 1997; Tanti *et al.*, 2013). Por outro lado, modelos animais de estresse crônico, como derrota social, submissão social e estresse crônico imprevisível estão associados à diminuição da neurogênese no GD ventral (Lehmann *et al.*, 2013; Mahar *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Além disso, o tratamento crônico com antidepressivos aumenta a neurogênese predominantemente no GD ventral e neutraliza os efeitos do estresse nesta sub-região tanto em roedores (Mahar *et al.*, 2014) quanto em humanos (Boldrini *et al.*, 2009).

No hipocampo, a conectividade celular básica do circuito trissináptico é mantida em toda a extensão dorso-ventral (Christensen *et al.*, 2010). Entretanto, a conectividade aferente e eferente do hipocampo difere acentuadamente entre os polos dorsal e ventral (Strange *et al.*, 2014). De acordo com seu papel no processamento no estresse e humor, o hipocampo ventral está no centro de um circuito neural complexo que regula a ansiedade e a emoção. Estudos recentes mostraram que este circuito neural inclui projeções

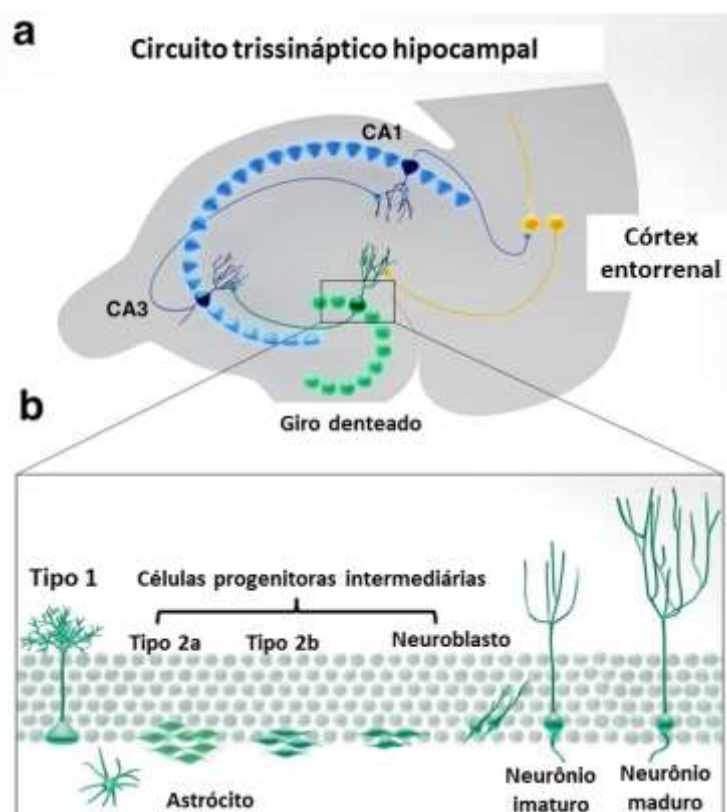
glutamatérgicas do hipocampo ventral para várias estruturas de processamento a jusante que estão envolvidas na regulação da ansiedade, respostas ao estresse e busca de recompensa, implicados no processo de medo e interação social (Padilla-Coreano *et al.*, 2016). Projeções do hipocampo ventral ao núcleo accumbens regulam a liberação de dopamina da área tegmentar ventral e estão implicadas na busca de prazer e recompensa (Britt *et al.*, 2012), bem como na regulação da susceptibilidade ao estresse e resiliência (Bagot *et al.*, 2015). O hipocampo ventral é também um importante regulador do sistema neuroendócrino, que inibe a atividade do eixo HPA e a liberação de glicocorticóides. No nível do circuito neural, as projeções do hipocampo ventral ativam os interneurônios GABAérgicos, que por sua vez inibem a produção do hormônio liberador de corticotrofina a partir do núcleo paraventricular do hipotálamo (Anacker *et al.*, 2014).

No cérebro de mamíferos, a neurogênese adulta ocorre em duas regiões, na zona subgranular (ZSG) no GD da formação hipocampal, uma região importante para formação de memória e funções cognitivas, e na zona subventricular (ZSV) dos ventrículos laterais (Oomen *et al.*, 2014). Na ZSV, os resíduos de células B1 revestem a fronteira entre o corpo do estriado e o ventrículo lateral. Essa subpopulação de células possui propriedades astrogliais e atua como células-tronco neurais. As células B1 dão origem a progenitores intermediários, que dividem-se gerando os neurônios destinados ao bulbo olfatório (Kriegstein e Alvarez-Buylla, 2009). Em roedores, as células progenitoras localizadas na ZSV migram em direção ao bulbo olfatório por uma via bem definida denominada corrente migratória rostral. Após alcançarem o centro do bulbo olfatório, essas células migram radialmente em direção às camadas celulares, aonde se diferenciam em uma grande variedade de tipos celulares, incluindo neurônios periglomerulares, interneurônios e também astrócitos e oligodendrócitos (Scorza *et al.*, 2005).

Ao contrário das células B1 na ZSG, que se encontram na parede ventricular, com prolongamentos que entram em contato com o líquido cefalorraquidiano, as células da glia radial na ZSG residem mais profundamente no parênquima cerebral na camada de células granulares do GD da formação hipocampal, que não tem contato com o sistema ventricular e atua como células tronco neurais, também conhecidas como células tipo 1 (Ghosh, 2019). As células da glia radial geram progenitoras intermediários (células tipo 2a e 2b), que se diferenciam em células do tipo 3 ou células granulares imaturas, astrócitos radiais tem três domínios principais. O lado dos astrócitos radiais, conhecido como

domínio proximal, está voltado para hilo e tem contato com vasos sanguíneos e processos laterais, que também entram em contato com os outros astrócitos radiais (Kitamura *et al.*, 2009). O segundo domínio é o domínio intermediário, que inclui o corpo da célula e o eixo principal. O domínio intermediário dos astrócitos radiais interage com células progenitoras intermediárias e células granulares. Este segundo domínio é importante para as interações célula-célula de células tronco neurais com sua progênese e para detecção de atividade neural local e sinalização de células granulares. O terceiro domínio é o domínio distal, que é altamente ramificado e tem contato com outras células granulares, axônios e sinapses na camada molecular (Merkle *et al.*, 2014). As células progenitoras primárias são conhecidas como células do tipo I ou do tipo B. As mesmas se dividem para produzir progenitoras em estágio intermediário (tipo 2, tipo 3 ou células tipo D), que então passam por mais ciclos de divisão celular para gerar neurônios granulares imaturos pós mitóticos. Esses neurônios glutamatérgicos então se integram ao GD como componentes funcionais dos circuitos do hipocampo (**Figura 3**) (Van Praag *et al.*, 2002; Hevner *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2008). Sinais ambientais regulatórios desempenham um papel crucial na identificação do destino progenitor neural para se tornarem neurônios ou astrócitos (Kempermann *et al.*, 2015).

Figura 3- Fases da neurogênese no hipocampo adulto



Legenda: O circuito neural trissináptico no hipocampo do córtex entorrinal através do GD, CA3 e CA1. b Processos de desenvolvimento da neurogênese do hipocampo adulto. Células-tronco neurais adultas no hipocampo (células gliais semelhantes a glia, células Tipo 1) e sua diferenciação através de progenitores intermediários para amadurecer neurônios GD. Fonte: adaptado de Toda et al., 2019.

Uma das vias que participa deste processo de sobrevivência e proliferação de novos neurônios é a via de sinalização que tem a participação da proteína mTOR. Quando esta proteína é fosforilada, na sequência da cascata bioquímica ocorre a fosforilação da 4EBP1, a mesma se separa da proteína eIF4E que fica livre para se ligar em outras proteínas relacionadas com fatores necessários para tradução de novas proteínas (Takei e Nawa, 2014). Assim, esta via de sinalização contribui para processos de crescimento, proliferação e sobrevivência neuronal. Com aumento da idade ocorre uma diminuição da neurogênese, portanto a promoção da neurogênese hipocampal tornou-se uma nova estratégia para prevenção e tratamento de diversas patologias, como a depressão e DA (Lazarov e Marr, 2010).

Na depressão ocorre uma deficiência de fatores neurotróficos, como o BDNF no hipocampo, o que contribui para uma diminuição na sobrevivência e proliferação de neurônios hipocámpais (Bus e Molendijk, 2016). Tem sido reportado que em roedores

submetidos a modelos de depressão ocorre uma diminuição de BDNF no hipocampo, como por exemplo em camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível (Chai *et al.*, 2019) e estresse crônico (Zhong *et al.*, 2018), bem como no modelo de estresse induzido por predador (Wu *et al.*, 2019) e depressão induzida por corticosterona (Pazini *et al.*, 2017). Em pacientes com depressão o BDNF também se encontra reduzido no plasma (Uint *et al.*, 2019) e no soro (Chang *et al.*, 2018). Há relato também de redução desta neurotrófica no hipocampo *post mortem* de pacientes suicidas (Youssef *et al.*, 2018). Níveis aumentados de BDNF no GD foram encontrados em amostras *post mortem* de indivíduos com depressão submetidos a tratamento com antidepressivo quando comparado a indivíduos com depressão que não estavam sendo tratados com antidepressivos (Chen *et al.*, 2001).

Na DA também ocorre uma diminuição dos níveis de fatores neurotróficos, como o BDNF. Um estudo feito em células SH-SY5Y mostrou que os níveis de BDNF diminuem após um insulto com A β e que esta diminuição está relacionada com a diminuição de CREB, um fator que regula a transcrição de BDNF (Rosa e Fahnstock, 2015). Em modelos animais de DA também é comum a diminuição do conteúdo de BDNF no hipocampo de roedores, proveniente da administração de A β ₁₋₄₂ (Qiu *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2019) e no modelo de animal transgênico APP/PS1 (Liu, H. *et al.*, 2015). Em idosos os níveis de BDNF no soro podem estar diminuídos e mediar o declínio do volume do hipocampo relacionado à idade (Erickson *et al.*, 2010). Além disso, um estudo em pacientes com DA mostrou que os níveis de BDNF estão diminuídos no plasma ou no soro e os níveis de CREB também estão diminuídos nos linfócitos (Platenik *et al.*, 2014; Balietti *et al.*, 2018; Ng *et al.*, 2019). Além disso, há evidências de prejuízo na neurogênese hipocampal em indivíduos portadores da DA (Moreno-Jimenez *et al.*, 2019).

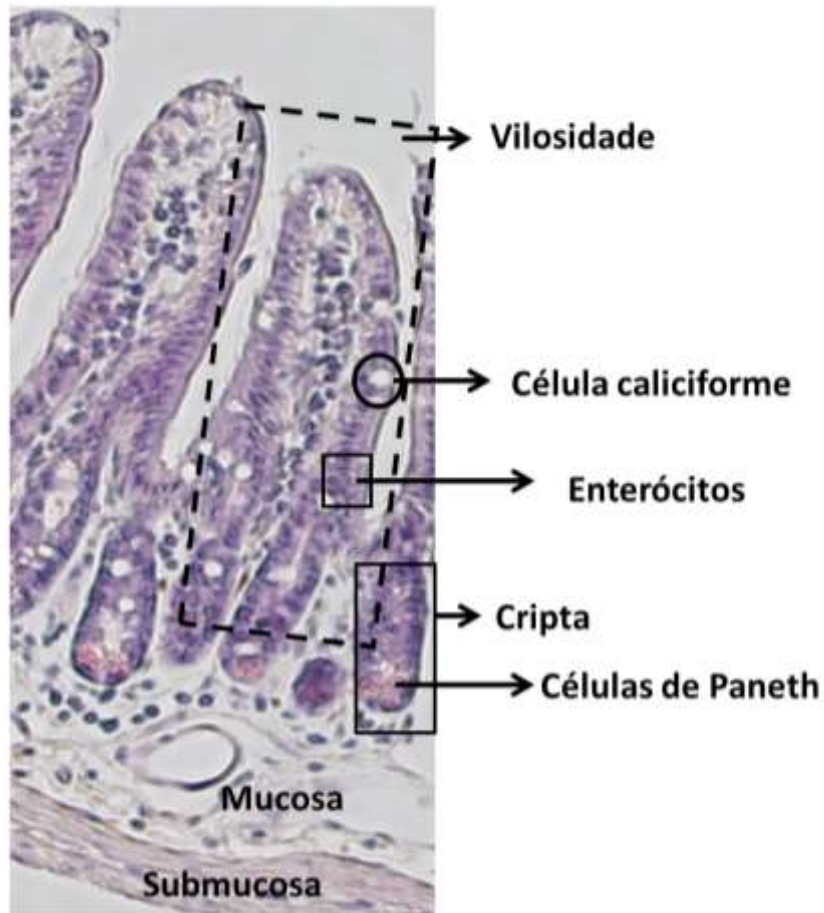
A neurogênese hipocampal adulta pode ser influenciada positivamente por diversos fatores, incluindo antidepressivos e exercício físico. Tem sido sugerido que alterações na composição da microbiota intestinal podem influenciar a expressão de BDNF no hipocampo e a neurogênese, através da modulação da atividade do nervo vago, o qual exerce um papel bidirecional na comunicação entre o intestino e o cérebro (O'Leary *et al.*, 2018). O tratamento com antibióticos a longo prazo em camundongos adultos é suficiente para induzir a diminuição da neurogênese no hipocampo nesses animais e resultam em déficits na tarefa de reconhecimento de novo objeto (Mohle *et al.*, 2016).

1.3.2. Eixo intestino-microbiota-cérebro

Ultimamente vem sendo destacada a influência de órgãos periféricos no comportamento e em doenças relacionadas com o SNC. Destaca-se neste trabalho o intestino, órgão que faz parte do segmento do canal alimentar e é responsável pela digestão de alimentos e absorção de nutrientes (Dinan e Cryan, 2017a). O intestino delgado é um órgão tubular de 6 a 7 metros de comprimento, começando no piloro do estômago e terminando na válvula ileocecal. Do mais proximal ao distal, o intestino delgado é dividido em duodeno, jejuno e íleo (Volk e Lacy, 2017). Enquanto o intestino grosso é o principal responsável pela absorção e transporte de água e eletrólitos, a principal função do intestino delgado é a digestão e absorção de nutrientes (Volk e Lacy, 2017; Spiller e Hoad, 2019). Cada região do intestino delgado pode absorver e digerir uma variedade de nutrientes, incluindo carboidratos, proteínas, gorduras, água, vitaminas lipossolúveis, minerais e micronutrientes (Kiela e Ghishan, 2016). As células da mucosa intestinal responsáveis pela absorção são os enterócitos, os quais têm cerca de 3000 microvilosidades em sua superfície, ajudando a aumentar a área da superfície para facilitar a absorção em 30 a 600 vezes (Volk e Lacy, 2017).

As vilosidades são prolongamentos da parede do intestino, dispostas lado a lado regularmente ao longo de toda sua superfície interna. Essas vilosidades são cobertas por células epiteliais colunares. Quando há diminuição da quantidade e tamanho dessas vilosidades, há diminuição de capacidade do intestino digerir e absorver nutrientes, sendo essa condição comum em patologias como doença celíaca e síndrome do intestino irritável (Ensari e Marsh, 2018). As células da cripta também são encontradas no intestino delgado, secretam diversas enzimas, como sacarase e maltase que atuam na digestão dos dissacarídeos sacarose e maltose, respectivamente. Muitas proteínas de transporte são responsáveis pelo transporte de solutos através do trato gastrointestinal, enquanto o movimento de fluidos através do epitélio acontece devido ao transporte ativo de principalmente sódio, cloreto e bicarbonato (Traber *et al.*, 1992). As células caliciformes são presentes também, tem como função secretar mucina que se dissolve na água formando muco, protegendo o revestimento intestinal (**Figura 4**). A exocitose desse muco é dependente de vários processos celulares que parecem modular o acúmulo e a secreção de grânulos de mucina. (Kim e Khan, 2013; Birchenough *et al.*, 2015).

Figura 4 - Epitélio duodenal do intestino delgado

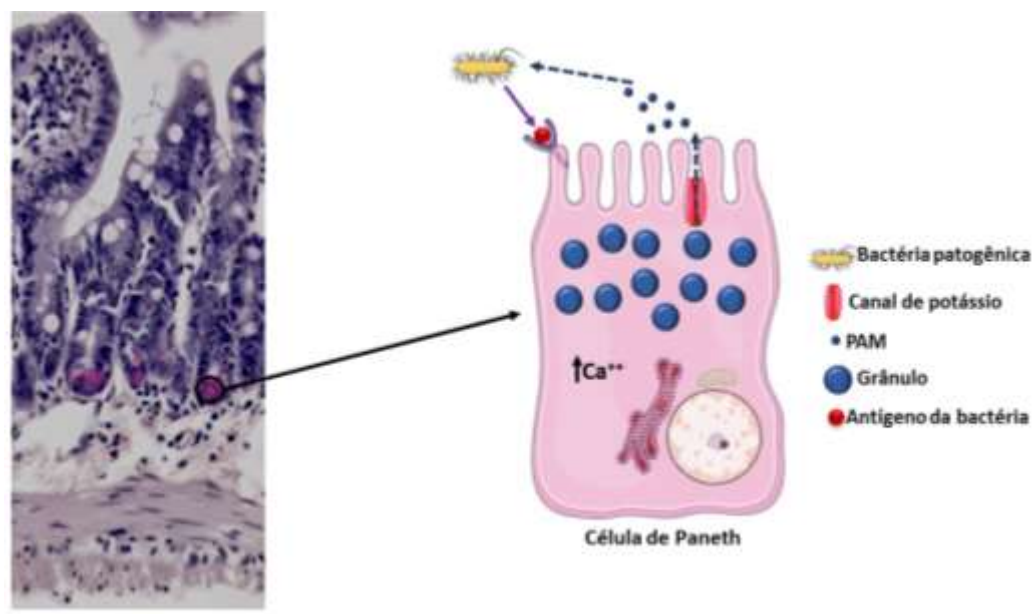


Legenda: Representação de estruturas presentes no intestino obtida por coloração com hematoxilina e eosina. A estrutura maior é a vilosidade, nela estão presentes os enterócitos e entre eles as células caliciformes. Abaixo está mostrada a cripta de Lieberkühn contendo as células de Paneth. Fonte: do Autor.

Além das células anteriormente mencionadas, temos as células de Paneth, as quais estão mostradas na **Figura 4**, que são células epiteliais encontradas nas posições inferiores das criptas no intestino delgado. Estas células são responsáveis pela homeostase celular, bem como no estabelecimento e configuração da barreira da mucosa intestinal (Gassler, 2017). No intestino, um complexo sistema molecular é estabelecido para manter a homeostase do microbioma do hospedeiro e para moldar a composição das bactérias que colonizam o intestino. Para este propósito, as células de Paneth possuem grânulos contendo diferentes tipos de peptídeos antimicrobianos, que são substâncias de defesa do hospedeiro. A liberação do conteúdo desses grânulos ocorre após a interação de antígenos bacterianos com receptores do tipo *Toll* presentes nessas células. Posteriormente ocorre um aumento de cálcio intracelular, ativando canal de potássio dependente de cálcio

(mIKCaI, em roedores). Assim o conteúdo dos grânulos é liberado para o lúmen, com objetivo de conter microorganismos patogênicos e manter a saúde intestinal (Ayabe *et al.*, 2000; Ouellette, 2006) (**Figura 5**).

Figura 5- Liberação de peptídeos antimicrobianos pela célula de Paneth



Legenda: As células de Paneth ficam localizadas no fundo das criptas de Lieberkühn no epitélio do intestino delgado. Após reconhecimento do antígeno da bactéria patogênica pelo receptor, ocorre um aumento de cálcio intracelular, seguido da abertura de canal de potássio dependente de cálcio. Assim ocorre a liberação de peptídeos antimicrobianos dos grânulos para o lúmen do intestino, podendo ter ação nas bactérias patogênicas. Fonte: Do autor.

As defensinas são a principal família de peptídeos antimicrobianos secretados pelas células de Paneth. Além das defensinas, as células de Paneth são capazes de secretar outros peptídeos antimicrobianos, incluindo lisozima, fosfolipase secretora A2 (sPLA2), RegIII, angiogenina 4 e catelicidinas (Peterson e Artis, 2014).

O eixo intestino-cérebro é composto pela comunicação bidirecional entre SNC e periferia, envolvendo sistema endócrino (eixo HPA), sistema imune (citocinas e quimiocinas) e sistema nervoso autônomo. O sistema nervoso autônomo, simpático e parassimpático impulsiona os sinais aferentes decorrentes do lúmen transmitidos por vias de sinalização entéricas, espinhais e vagais para o SNC e sinais eferentes do SNC para a parede intestinal (Dinan e Cryan, 2017a). O eixo HPA é considerado o núcleo do eixo eferente de estresse que coordena as respostas adaptativas do organismo a diversos estímulos estressores. Particularmente, está localizado no sistema límbico, uma zona

crucial do encéfalo predominantemente envolvida na memória e nas respostas emocionais. O estresse ambiental, ativa este sistema que através da secreção do fator liberador de corticotrofina (CRF) do hipotálamo, estimula a secreção do fator adrenocorticotrófico (ACTH) da glândula hipófise, que por sua vez, leva a liberação de cortisol pelas glândulas suprarrenais (Menke, 2019). O cortisol é um hormônio relacionado com estresse, que afeta muitos órgãos humanos, incluindo o encéfalo (Swaab *et al.*, 2005). Assim, ambas as linhas de comunicação neural e hormonal interagem para permitir que o cérebro influencie as atividades das células efectoras funcionais intestinais, como as células imunes, epiteliais, neurônios entéricos e células musculares lisas. Estas mesmas células estão sob a influência da microbiota intestinal cujo papel contribuinte nas comunicações recíprocas do eixo intestino - cérebro tem sido investigado (Scott *et al.*, 2013; Dinan e Cryan, 2017b).

Outro componente desse eixo é a microbiota intestinal, que é o conjunto de microrganismos que habita o intestino. É estimado que o corpo de um ser humano adulto tenha 100 trilhões de bactérias, as quais 80% residem no intestino. O microbioma intestinal hospeda mais de 100 espécies bacterianas, que em conjunto são responsáveis pela manutenção do equilíbrio dinâmico do metabolismo (Lozupone *et al.*, 2012). As bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes são as mais abundantes no intestino (Rinninella *et al.*, 2019).

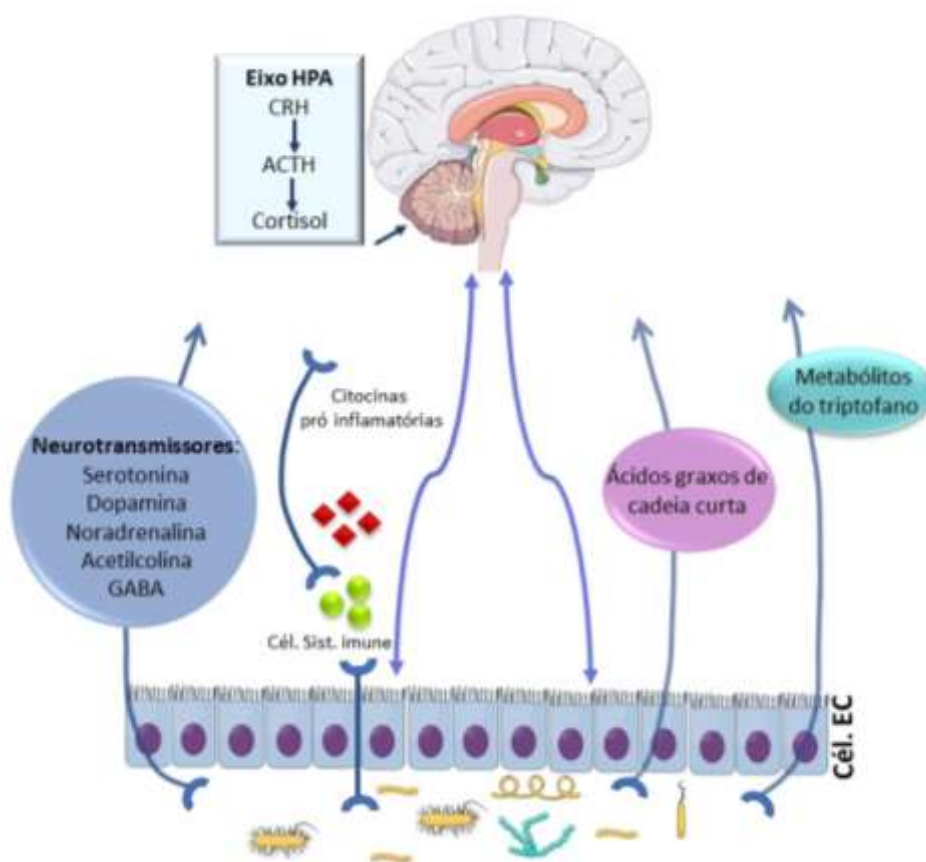
Estudos recentes sugerem que a microbiota entérica tem um impacto importante no eixo intestino-cérebro (podendo ser chamado de eixo intestino-microbiota-cérebro), interagindo não apenas localmente nas células intestinais, mas também diretamente com SNC através de vias de sinalização neurais, endócrinas, imunes e metabólicas. O envolvimento da microbiota no SNC é o mais recente paradigma em neurociências, mostrando que essa comunicação pode ser útil na descoberta de novos tratamentos para doenças que afetam o SNC (Liu *et al.*, 2015; Dinan e Cryan, 2017a; Scriven *et al.*, 2018).

Os microrganismos do intestino desempenham um papel importante na promoção do desenvolvimento e homeostase do adulto, por exemplo, eles podem afetar as funções metabólicas humanas decompondo os complexos polissacarídeos nos alimentos (Wang e Wang, 2016). Além disso, os microrganismos intestinais podem regular o movimento intestinal, manter a barreira intestinal íntegra e distribuir gordura no tecido. Esses microrganismos podem afetar a função imunológica através do desenvolvimento de tecido linfóide associado ao intestino e pela prevenção da colonização de patógenos,

podendo afetar o metabolismo energético e a função mitocondrial do hospedeiro (Wang e Kasper, 2014).

Várias evidências têm sugerido que a modulação de alguns mecanismos no SNC ocorra pela microbiota intestinal, principalmente através de mecanismos neuroimunes e neuroendócrinos, frequentemente envolvendo o nervo vago (Forsythe *et al.*, 2014). Essa comunicação é mediada por vários metabólitos gerados pelos microrganismos residentes do intestino, que incluem ácidos graxos de cadeia curta, ácidos biliares secundários, precursores de hormônios e neurotransmissores e metabólitos ativos. Estas moléculas propagam sinais principalmente através da interação com células enteroendócrinas, células enterocromafins e o sistema imune da mucosa intestinal (Bonaz *et al.*, 2018). No entanto, alguns desses metabólitos podem atravessar a barreira intestinal, percorrer a circulação sistêmica e atravessar a barreira hematoencefálica. Ainda não está completamente elucidado se essas moléculas atingem alvos celulares no SNC diretamente ou apenas induzem respostas centrais a longa distância via nervo vago ou aferentes espinhais. Além de gerar esses metabólitos que ativam os mecanismos endógenos de sinalização do SNC, a microbiota pode produzir ou contribuir independentemente para produção de várias moléculas neuroativas, entre elas o ácido gama-aminobutírico (GABA), a serotonina (5-HT), a norepinefrina e a dopamina (**Figura 5**). No entanto, ainda não está bem elucidado se estes compostos alcançam receptores e contribuem para ativar vias de sinalização no SNC (Cussotto *et al.*, 2018; Scriven *et al.*, 2018).

Figura 6- Eixo intestino-microbiota-cérebro



Legenda: A microbiota intestinal pode sinalizar para o cérebro através de várias vias que incluem: regulação da atividade imunológica e produção de citocinas pró-inflamatórias que podem estimular o eixo HPA para produzir o hormônio liberador de corticotrofina e cortisol, ou impactar diretamente na atividade imunológica do SNC, através da produção de ácidos graxos de cadeia curta como propionato, butirato e acetato. A microbiota também produz neurotransmissores que podem entrar na circulação e atravessar a barreira hematoencefálica modulando o metabolismo do triptofano e metabólitos como a serotonina, ácido quinurênico e ácido quinolínico. As vias neuronais e espinais, particularmente as vias de sinalização aferentes do nervo vago, são críticas na mediação do efeito da microbiota intestinal na função encefálica e no comportamento. Os ácidos graxos de cadeia curta e o indol produzidos pela microbiota também têm impacto benéfico nas células EC do sistema nervoso entérico. Abreviaturas: ACTH, hormônio adrenocorticotrópico; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; EC, células enterocromafins; GABA, ácido gama-aminobutírico; HPA, hipotálamo-hipófise-adrenal. Fonte: adaptado de Kennedy et al., 2017.

Com o aumento da idade ocorre uma diminuição da diversidade de bactérias na microbiota intestinal (Kowalski e Mulak, 2019). A idade é o fator de risco mais importante para DA, e uma das mais modificações mais proeminentes relacionadas à idade é a mudança na composição da microbiota, que além de regular a estrutura e a

função do eixo intestino-cérebro, também influencia no desenvolvimento do cérebro e do comportamento (Luczynski *et al.*, 2016; Sharon *et al.*, 2016; Carlson *et al.*, 2018). Além disso, com aumento da idade ocorre uma hiperestimulação do sistema imunológico que resulta em um estado crônico de inflamação de baixo grau, a qual pode estar associada ao estado inflamatório persistente da mucosa intestinal. Estas alterações inflamatórias no intestino estão relacionadas à diminuição da diversidade e estabilidade da microbiota intestinal (Mohajeri, 2019). Estas alterações levam à quebra da barreira intestinal, ao aumento das citocinas pró-inflamatórias e produtos derivados de bactérias na circulação, ao comprometimento da barreira hematoencefálica e à neuroinflamação (Kohler *et al.*, 2016).

Ao menos que o hospedeiro seja exposto a estressores ecológicos significativos, a microbiota intestinal mantém uma composição estável em adultos. No entanto, algumas alterações específicas associadas ao aumento da idade foram observadas em pacientes com DA, como por exemplo, uma redução na diversidade da microbiota intestinal, como também diminuição nas bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, bactérias que contribuem de forma benéfica com organismo de seu hospedeiro. Outros fatores também afetam a composição da microbiota ao longo da vida, tais como qualidade da dieta, ingestão de fibras, tratamento antimicrobiano ou infecções e prática de exercício físico (Kohler *et al.*, 2016; Kowalski e Mulak, 2019).

Mudanças na microbiota intestinal relacionadas com a idade e as interações com o sistema imunológico podem ser relevantes para o funcionamento cerebral em idosos. Há evidências de que a diminuição da estabilidade e diversidade da microbiota no idoso pode estar relacionada à redução do volume cerebral e da função cognitiva, uma vez que a diminuição no peso do cérebro ou na perda de massa cinzenta e branca é paralela as alterações do sistema imunológico, aumento do estresse oxidativo e acúmulo de A β em forma de placas no cérebro (Kohler *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017).

A microbiota intestinal é uma fonte significativa de amiloides, produzida por exemplo pela *Escherichia coli*. A produção de amiloide ajuda as bactérias a se ligarem umas às outras formando biofilmes e a auxiliando a resistir à destruição por fatores físicos ou imunológicos (Cherny *et al.*, 2005). Embora amiloides bacterianos sejam diferentes dos amiloides do SNC em sua estrutura primária, eles compartilham similaridade em sua estrutura terciária. A exposição de proteínas amiloides bacterianas no intestino podem causar a ativação do sistema imunológico, conseqüentemente aumentando a resposta

imune, podendo ocasionar a produção endógena de amiloide no cérebro (Kowalski e Mulak, 2019).

Já foi documentado em estudos *in vitro* e *in vivo* que os amiloides bacterianos podem atuar como proteínas priônicas, provocando a semeadura cruzada, na qual uma proteína amiloidogênica (curi, tau, A β , α -syn e Príon) faz com que outra (por exemplo, proteínas hospedeiras com uma estrutura primária diferente) sofra alteração conformacional, adotando uma estrutura terciária com maior porcentagem de folha β (Friedland e Chapman, 2017).

A microbiota também pode contribuir para o desenvolvimento da depressão. Em alguns modelos animais de depressão a microbiota também é alterada, indicando uma possível relação entre microbiota intestinal e o comportamento tipo-depressivo (Scriven *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2019; Pennisi, 2019). Estudos mostram que administração de cepas probióticas como *L. rhamnosus*, *B. infantis* (Slykerman *et al.*, 2017) e uma formulação de *L. helveticus* e *B. longum*, melhora o comportamento tipodepressivo em animais, além de aliviar sofrimento psicológico, incluindo parâmetros de depressão em humanos saudáveis (Messaoudi *et al.*, 2011). Infecções com patógenos podem induzir comportamento doentio em animais infectados, os quais apresentam fadiga, isolamento social, diminuição do apetite e aumento do comportamento tipo-ansioso (Lyte *et al.*, 2006; Gareau *et al.*, 2011; De Palma *et al.*, 2014). Intervenções na microbiota intestinal utilizando estresse ou antibióticos também estão associadas com comportamento tipo-depressivo e ansioso em roedores (Lurie *et al.*, 2015; Frohlich *et al.*, 2016; Guida *et al.*, 2018). Por outro lado, a suplementação com probióticos específicos pode prevenir ou reverter essas alterações comportamentais relacionadas à depressão e ansiedade (Slyepchenko *et al.*, 2014; Steenbergen *et al.*, 2015; Scriven *et al.*, 2018; Wallace *et al.*, 2019).

1.4. EXERCÍCIO FÍSICO COMO ESTRATÉGIA NA PREVENÇÃO DA DEPRESSÃO E DA

Com o aumento da expectativa de vida é esperado um maior número de indivíduos com doenças neurodegenerativas, entre elas a DA. Com essa perspectiva tem-se a necessidade de novas abordagens farmacológicas e não farmacológicas para prevenção e tratamento de DA, como também para as comorbidades que podem afetar esses pacientes (Castellani e Perry, 2012). Uma abordagem não farmacológica que pode ser usada para

melhorar qualidade de vida e prevenir DA é o exercício físico, que quando praticado de forma regular reduz sintomas de depressão e demência mostrando que o exercício físico pode ser uma alternativa de tratamento adjuvante para doenças que afetam o SNC (Matura *et al.*, 2016). O efeito positivo do exercício no SNC está relacionado com aumento da síntese e liberação de neurotrofinas, que pode resultar em aumento da neurogênese e neuroplasticidade hipocampal (Deslandes *et al.*, 2009). Estudos mostram que a prática de exercício físico moderado em adultos melhora aspectos de qualidade de vida e protege contra o declínio cognitivo que ocorre no envelhecimento (Sofi *et al.*, 2011; Kulmala *et al.*, 2014).

Já foi reportado na literatura que a prática regular de exercício físico aeróbico previne atrofia de regiões cerebrais relacionadas à idade e aumenta o volume dos lobos frontais e do lobo temporal superior esquerdo, que estão envolvidos na cognição, memória e controle da atenção (White e Castellano, 2008; Erickson *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2014). O treinamento aeróbico de intensidade moderada mostrou uma melhora na ativação funcional do cérebro em idosos (idade entre 70 e 80 anos), permitindo maior eficiência ao completar tarefas e pode proporcionar melhora do humor (Ten Brinke *et al.*, 2015; Morris *et al.*, 2017).

Estudos têm mostrado que o exercício físico está envolvido na regulação da proliferação, diferenciação, sobrevivência e maturação das células-tronco neurais, podendo ser uma estratégia para promoção da neurogênese hipocampal adulta (van Praag *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2016). Na fase inicial da neurogênese na ZSV, acredita-se que o exercício físico aumenta o fornecimento de energia para dar suporte a células que estão se desenvolvendo. O exercício físico pode estimular o aumento da liberação de neurotransmissores, como glutamato e serotonina na área cortical ou subcortical, auxiliando na promoção da neurogênese adulta (van Praag, 2008; Liu e Nusslock, 2018a). Ainda, o exercício físico está envolvido no aumento da síntese de fatores neurotróficos no SNC, como o BDNF, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de diferenciação de crescimento 11 (GDF11) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), que estão envolvidos no processo de desenvolvimento e maturação de novos neurônios (Mokhtarzade *et al.*, 2018; Tari *et al.*, 2019).

A prática de exercício físico aeróbico tem mostrado impacto positivo no intestino, aumentando a diversidade microbiana e o metabolismo funcional em humanos e camundongos (Monda *et al.*, 2017; Dalton *et al.*, 2019). A alteração dos perfis bacterianos e a influência dos subprodutos produzidos a partir das bactérias intestinais por meio do exercício físico podem ter o potencial de reverter as condições associadas com a obesidade, doenças metabólicas, má alimentação, juntamente com condições neurais e comportamentais.

Os efeitos do exercício físico sobre a função intestinal parecem depender da sua intensidade. Vários estudos relatam que o exercício físico praticado de forma intensa pode levar a um aumento na permeabilidade intestinal, dano gastrointestinal e endotoxemia leve. Porém, os treinos de exercício físico direcionados ao tratamento da síndrome do intestino irritável proporcionam melhorias nos sintomas dessa síndrome (Clark e Mach, 2016; Hajizadeh Maleki e Tartibian, 2017; Engel *et al.*, 2018). O exercício físico parece ser uma potencial influência externa sobre a capacidade de alterar a biodiversidade intestinal de maneira quantitativa e qualitativa. Essas mudanças provenientes da prática de exercício físico aeróbico de intensidade moderada sugerem que este podem fornecer benefícios para a função gastrointestinal, humor e saúde mental, destacando que o exercício físico pode mediar melhorias tanto no intestino quanto no cérebro (O'sullivan *et al.*, 2015; Dalton *et al.*, 2019).

O nervo vago está na interface do eixo intestino-cérebro, sendo que sua ativação alterada é comumente encontrada em pacientes com distúrbios relacionados ao intestino quanto em transtornos psiquiátricos como depressão. Várias formas de exercícios físicos, incluindo yoga e treinamento físico aeróbico, podem melhorar o tônus parassimpático (Breit *et al.*, 2018). Além disso, os efeitos de probióticos no eixo HPA e nos sintomas relacionados com a depressão são abolidos através do procedimento da vagotomia (secção cirúrgica do nervo vago) (Breit *et al.*, 2018). Essas evidências sugerem que quaisquer alterações provenientes da prática de exercício físico na diversidade e quantidade de bactérias na microbiota intestinal seriam potencialmente manifestadas através da influência na comunicação vagal entre o intestino e o cérebro (Carabotti *et al.*, 2015; Breit *et al.*, 2018).

Como mencionado anteriormente, o aumento de BDNF proveniente da prática de exercício físico parece ser um dos principais fatores relacionado com a melhora na depressão e nos sintomas cognitivos presentes na DA, bem como na prevenção ou

reversão da atrofia em regiões específicas do cérebro (Sleiman *et al.*, 2016; Walsh *et al.*, 2018). Estudos que utilizam antibióticos para eliminar a microbiota de animais, mostram que esta intervenção causa déficits na neurogênese hipocampal (Mohle *et al.*, 2016; Foster *et al.*, 2017) Foi demonstrado que a utilização de probióticos e exercícios físicos aeróbicos reverteram individualmente o declínio da neurogênese e da função cognitivas de camundongos tratados com antibióticos (Luczynski *et al.*, 2016; Möhle *et al.*, 2016). Embora não seja possível afirmar que os efeitos do exercício físico na neurogênese ocorram devido a alterações na microbiota intestinal, estudos mostram que a suplementação com *Bifidobacterium* aumentou a expressão de BDNF no cérebro de camundongos (Bercik *et al.*, 2011; Savignac *et al.*, 2013).

Em humanos adultos, os filos Firmicutes e Bacteroidetes são geralmente presentes em maior quantidade na microbiota intestinal, com os outros filos sendo cerca de 10% da composição da microbiota (Dalton *et al.*, 2019). O filo Firmicutes tem bactérias na sua maioria com parede celular gram-positiva. Esse filo contém mais de 250 gêneros de bactérias. O filo Bacteroidetes tem na sua maioria bactérias com parede celular gram-negativas. Este filo inclui cerca de 20 gêneros. A composição da microbiota intestinal é mantida pela relação simbiótica entre bactérias patogênicas e não patogênicas e pode ser demonstrada pela relação equilibrada dos filos Bacteroidetes e Firmicutes (Conlan *et al.*, 2012). Mudanças na composição da microbiota intestinal podem acontecer devido a diversos fatores como mudanças na dieta, ingestão de antibióticos ou invasões de patógenos que podem causar mudança para um estado de desequilíbrio e inflamatório (Lozupone *et al.*, 2012). Atualmente, é postulado que mudanças negativas na microbiota intestinal desempenham um papel fundamental no desenvolvimento de várias doenças incluindo diabetes tipo 2 (Hartstra *et al.*, 2015), síndrome do intestino irritável (Hoveyda *et al.*, 2009), doenças cardiovasculares (Tang e Hazen, 2014), alergias (Inoue e Shimojo, 2015) e transtornos de humor (Scriven *et al.*, 2018).

Embora o impacto do exercício físico na relação entre o intestino e o cérebro não seja totalmente conhecida (O'sullivan *et al.*, 2015), há relatos que o exercício aeróbico pode aumentar a diversidade microbiana e o metabolismo funcional em humanos e camundongos (Bermon *et al.*, 2015; Mika *et al.*, 2015; Welly *et al.*, 2016). A prática de exercício físico é capaz de alterar os perfis bacterianos, influenciar os metabólitos produzidos, podendo reverter condições associadas à obesidade, doenças metabólicas, má

alimentação, transtornos mentais e comportamentais (Monda *et al.*, 2017; Dalton *et al.*, 2019).

Um estudo mostra que em atletas há maior proporção de bactérias do filo Firmicutes e menor de Bacteroidetes, comparados ao grupo controle. Em animais há divergência nos resultados, por exemplo um estudo com exercício físico forçado por 16 semanas (roda de corrida)/5 x por semana mostrou aumento das bactérias do filo Firmicute e diminuição do filo Bacteroidetes em camundongos exercitados comparado ao grupo controle com dieta hiperlipídica (Kang *et al.*, 2013). Por outro lado, um estudo desenvolvido por Evans e colaboradores (2014) relatou valores de Firmicutes inferiores e Bacteroidetes superiores após um protocolo de 12 semanas de corrida voluntária em camundongos em relação aos animais sedentários (Evans *et al.*, 2014). Este estudo também demonstrou que o exercício físico foi capaz de prevenir a obesidade induzida por dieta hiperlipídica. Os diferentes resultados entre esses estudos sugerem que o papel do exercício físico na microbiota ainda não está totalmente elucidado (Dalton *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

Segundo a OMS e a Associação Internacional de Doença de Alzheimer estima-se que o número de indivíduos com DA pode chegar a 67,5 milhões em 2050. Como consequência aumentaria o número de indivíduos com a comorbidade depressão/DA (Gauthier *et al.*, 2010; Guzman-Martinez *et al.*, 2019). Considerando a alta prevalência e gravidade destas condições clínicas, existe a necessidade de estratégias para prevenção desta comorbidade.

Tendo em vista que: a) a farmacoterapia da DA é apenas paliativa, tratando sintomas sem ser eficaz em diminuir a progressão da doença. b) o BDNF promove benefício para a saúde mental, com melhora na cognição e humor (Chen *et al.*, 2015); c) o exercício físico promove diminuição da neuroinflamação e estresse oxidativo no SNC (Garcia-Mesa *et al.*, 2016; Svensson *et al.*, 2015); d) o exercício físico promove aumento de BDNF no hipocampo (Koo *et al.*, 2013; Wrann *et al.*, 2013; Chen, N. *et al.*, 2015); e) a prática de exercício físico promove alterações positivas na microbiota intestinal; e f) a terapia proposta neste projeto seria de fácil acesso aos pacientes e já é utilizada por humanos para outros fins (Dishman *et al.*, 2006), hipotetizamos que o exercício aeróbico de resistência pode ter efeito preventivo sobre o comportamento tipodepressivo, alterações neuroquímicas, alterações morfológicas e na microbiota intestinal induzidas por um modelo da DA em camundongos.

Considerando o impacto social da depressão associada com a DA, esperamos contribuir para estabelecimento de possíveis alternativas terapêuticas que possam auxiliar na prevenção dessas enfermidades, bem como expandir os conhecimentos do envolvimento do exercício físico na saúde mental, contribuindo para a elucidação de alguns dos alvos celulares e moleculares envolvidos neste efeito benéfico.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito profilático do exercício físico aeróbico no comportamento tipo-depressivo, nas alterações neuroquímicas e morfológicas e na composição da microbiota intestinal induzido por $A\beta_{1-40}$ em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Investigar o efeito tipo antidepressivo e ansiolítico do exercício físico em camundongos submetidos à administração do $A\beta_{1-40}$;

b) Verificar o efeito do exercício físico sobre a proliferação e sobrevivência neuronal e níveis de BDNF no hipocampo de camundongos submetidos à administração do $A\beta_{1-40}$;

c) Investigar o efeito do exercício físico sobre a fosforilação de mTOR no hipocampo de camundongos submetidos à administração do $A\beta_{1-40}$;

d) Verificar o efeito do exercício físico sobre a morfologia duodenal de camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$;

e) Avaliar o efeito do exercício físico sobre a abundância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes no conteúdo fecal de camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$.

4 RESULTADOS

Os resultados dessa tese estão apresentados em dois capítulos. Cada capítulo é composto de uma rápida introdução sobre o tema abordado no mesmo, seguido das metodologias utilizadas, os resultados e as discussões pertinentes a cada capítulo. Além disso, cada capítulo possui conclusões parciais dos resultados obtidos. As referências de todos os capítulos encontram-se no final da tese.

Capítulo I – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE BDNF E VIA mTOR NO EFEITO PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELO PEPTÍDEO A β ₁₋₄₀

“Prophylactic effect of physical exercise on A β ₁₋₄₀-induced depressive-like behavior: role of BDNF, mTOR signaling, cell proliferation and survival in the hippocampus”

Julia M. Rosa, Francis L. Pazini, Gislaine Olescowicz, Anderson Camargo, Morgana Moretti, Joana Gil-Mohapel, Ana Lúcia S. Rodrigues. Publicado na *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 94:109646, 2019.

Capítulo II: EFEITO PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E DISFUNÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL INDUZIDO POR A β ₁₋₄₀

“Prophylactic effect of exercise on A β ₁₋₄₀-induced depressive-like behavior and gut microbiota dysfunction in mice”

Julia M. Rosa, Francis L. Pazini, Anderson Camargo, Ingrid Wolin, Gislaine Olescowicz, Livia B. Eslabão, Elisa C. Winkelmann-Duarte, Ana Lúcia S. Rodrigues. Submetido à *Life Sciences*.

CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO BDNF E DA VIA DE SINALIZAÇÃO DA mTOR NO EFEITO PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO INDUZIDO PELO PEPTÍDEO A β ₁₋₄₀

I.1. INTRODUÇÃO

A DA é uma enfermidade neurodegenerativa que se caracteriza por disfunção cognitiva progressiva, sendo a forma mais comum de demência e a principal causa de incapacidade no final da vida (Prince *et al.*, 2013). Embora o comprometimento cognitivo progressivo, particularmente o déficit na memória, seja o achado mais comum dessa doença, os sintomas neuropsiquiátricos são persistentes e afetam uma porcentagem significativa de pacientes (Galts *et al.*, 2019). A depressão é um dos transtornos neuropsiquiátricos mais comuns associados à DA, resultando em maior institucionalização e mortalidade. De fato, cerca de 50% dos pacientes com DA tem depressão ou sintomas depressivos (Chi *et al.*, 2014; Galts *et al.*, 2019). Embora os mecanismos subjacentes à comorbidade entre a DA e a depressão ainda não sejam totalmente compreendidos, alterações na neurogênese do hipocampo em adultos (ou seja, alterações na proliferação e na sobrevivência de células recém-geradas) têm sido relatadas tanto na DA quanto na depressão (Herbert e Lucassen, 2016; Pazini *et al.*, 2017).

O exercício físico tem sido proposto como uma possível estratégia de prevenção para a DA (Cass, 2017) e a depressão (Stanton e Reaburn, 2014). Os mecanismos subjacentes aos seus efeitos benéficos no contexto desses distúrbios não estão bem estabelecidos, mas podem estar relacionados à sua capacidade de potencializar a neurogênese hipocampal adulta (van Praag, Christie, *et al.*, 1999; van Praag, Kempermann, *et al.*, 1999; Saraulli *et al.*, 2017) e aumentar o suporte trófico através do aumento de BDNF (Liu e Nusslock, 2018b). De fato, o BDNF é altamente expresso no cérebro, e essa expressão aumenta após a prática de exercício físico (Berchtold *et al.*, 2002; Cotman e Berchtold, 2002; Binder e Scharfman, 2004; Farmer *et al.*, 2004; Cotman *et al.*, 2007; Boehme *et al.*, 2011). Além disso, o BDNF também pode ingressar no cérebro através da barreira hematoencefálica (Pan *et al.*, 1998). De especial interesse, o BDNF demonstrou ser essencial para a regulação da proliferação celular, bem como diferenciação, maturação e sobrevivência neuronal, contribuindo assim para a neuroplasticidade estrutural no hipocampo (Zigova *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 2006).

O BDNF pode se ligar ao seu receptor de TrkB, iniciando uma cascata de fosforilação podendo culminar na ativação da mTOR, que pode promover a sobrevivência neuronal, bem como neurogênese (Takei e Nawa, 2014). Embora tenha sido demonstrado que o exercício físico de força ou resistência crônica resulta em aumento da síntese de proteína miofibrilar e massa muscular através da ativação da sinalização de mTOR (Watson e Baar, 2014), os efeitos do exercício físico sobre a modulação da via de sinalização mediada por mTOR no cérebro não estão bem estabelecidos. Alguns estudos demonstraram aumento da fosforilação de mTOR (ativação) no hipocampo de roedores submetidos ao exercício físico (Fang *et al.*, 2013; Lloyd *et al.*, 2017), no entanto, outros não mostraram a fosforilação de mTOR ou não relataram alterações na fosforilação de mTOR no hipocampo e córtex pré-frontal após exercício físico (Elfving *et al.*, 2013).

Nos últimos anos, vários estudos têm sugerido que a sinalização de mTOR pode estar envolvida em doenças relacionadas à idade, incluindo DA, visto que o aumento da fosforilação desta proteína tem sido associado com a gravidade desta doença (Pei e Hugon, 2008). No entanto, os possíveis efeitos benéficos do exercício físico na modulação de mTOR em modelos de animais de DA são atualmente muito limitados (Watson e Baar, 2014). Porém, o exercício físico em esteira foi capaz de atenuar o aumento da fosforilação de mTOR em um modelo animal transgênico de DA (NSE/htau23) através da ativação da Akt/mTORC1 (Kang e Cho, 2015).

A administração do A β ₁₋₄₀ em roedores mimetiza alguns dos sintomas cognitivos presentes na DA (Prediger *et al.*, 2007; De Oliveira *et al.*, 2014). Além disso, esse modelo também é caracterizado pelo desenvolvimento de comportamento tipo- depressivo e ansioso (Pamplona *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2013; Lanznaster *et al.*, 2016; Rosa *et al.*, 2018), tornando-se um modelo útil para estudar mecanismos subjacentes à depressão associada à DA.

Diante desse cenário, o presente estudo avaliou o possível efeito profilático do exercício físico na prevenção da ocorrência de comportamento tipo-depressivo e ansioso e déficits cognitivos induzidos pela administração de A β ₁₋₄₀ em camundongos. Além disso, este estudo também investigou se o exercício físico modula a sinalização de BDNF e mTOR, bem como a proliferação e sobrevivência de células do hipocampo após a administração de A β ₁₋₄₀.

I.2. MATERIAIS E MÉTODOS

I.2.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos *Swiss* (30-40 g, 45-55 dias de idade) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brasil). Eles foram alojados em grupos de 10 animais por gaiola de plástico sob condições controladas de luz (das 7:00 às 19:00 horas) e temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). Os camundongos tiveram livre acesso ração e água e foram mantidos no biotério setorial para adaptação uma semana antes do início do protocolo experimental. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais especificados. Todas as manipulações foram realizadas entre 13:00 e 17:00 horas. Todos os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição (CEUA Nº 5142180518). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais usados nesses experimentos.

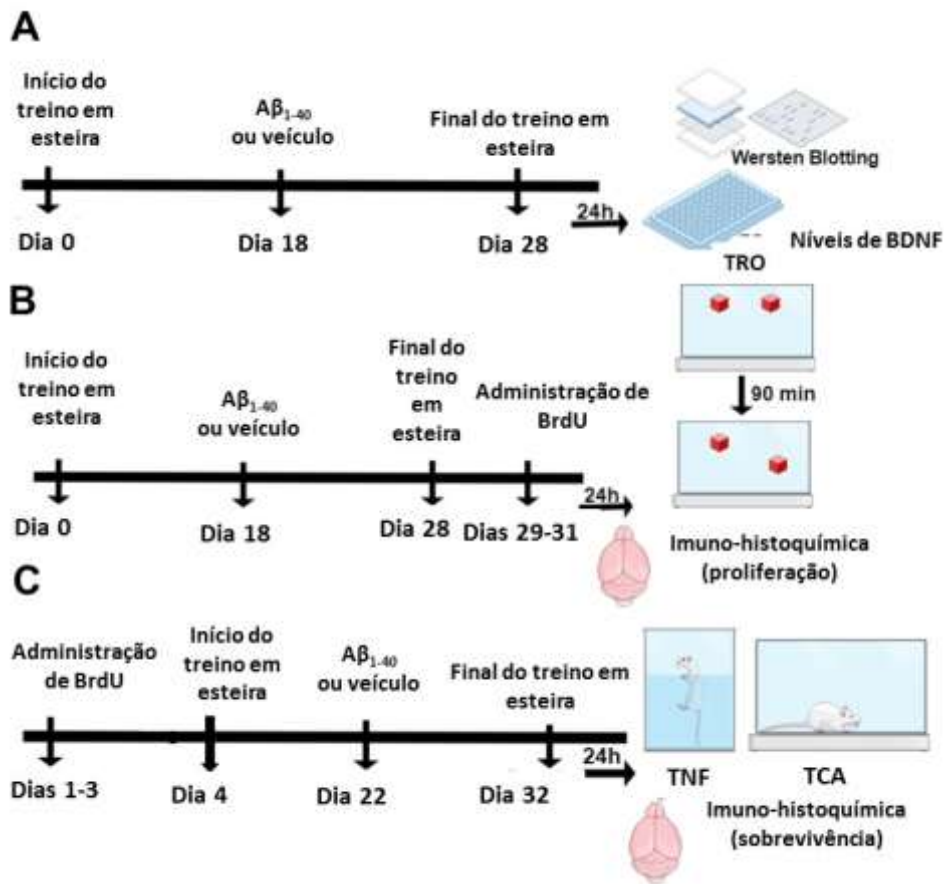
I.2.2. Tratamentos

$A\beta_{1-40}$ e 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados neste estudo. $A\beta_{1-40}$ foi dissolvido em solução tampão salina fosfato (PBS; pH 7,4; 1 mg/mL) e incubado a 37°C durante quatro dias para induzir a agregação. $A\beta_{1-40}$ (3 μl ; 400 pmol/camundongo) foi administrado por via intracerebroventricular (i.c.v.). BrdU é um análogo de timidina exógeno que pode ser incorporado ao DNA durante a fase S do ciclo celular como substituto da timidina remanescente nas células pós-mitóticas (Duque e Rakic, 2011). BrdU foi dissolvido em PBS e administrado intraperitonealmente (i.p.). A dose de BrdU (100 mg/kg, i.p.) e o protocolo de injeções foram escolhidos com base em estudo anterior Gil-Mohapel *et al.*, (2013). Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano (2,5%; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) antes de serem submetidos às injeções i.c.v., as quais foram realizadas à mão livre. Resumidamente, uma agulha hipodérmica de 0,4 mm de diâmetro externo presa a uma cânula ligada a uma seringa Hamilton de 25 μl foi inserida perpendicularmente através do crânio (não mais do que 2 mm no cérebro) de cada camundongo. $A\beta_{1-40}$ ou veículo (PBS) foi injetado diretamente no ventrículo lateral esquerdo, nas seguintes coordenadas de bregma: ântero-posterior (AP) 0,1 mm; mediolateral (ML) 1 mm e dorsoventral (DV) 3 mm. Todos os camundongos exibiram um comportamento normal dentro de 1 min após a injeção. A

injeção foi administrada por 30 segundos e a agulha permaneceu por mais 15 segundos para evitar o refluxo das substâncias injetadas. O local da injeção foi de 1 mm à esquerda do ponto médio em uma linha traçada através da base anterior das orelhas. Após a dissecação de cada encéfalo, o local da injeção foi examinado macroscopicamente, e em casos de posicionamento errado da injeção ou qualquer sinal de hemorragia cerebral, os cérebros foram excluídos das análises posteriores (<5%) (Rosa et al., 2018; Prediger et al., 2007). A β_{1-40} ou veículo foram administrados dez dias antes dos testes comportamentais (Ludka et al., 2017; Rosa et al., 2018).

Foram utilizados três grupos distintos de animais: os animais do grupo 1 foram submetidos ao exercício em esteira (5 dias/semana, 40 min por dia por 4 semanas) e submetidos à administração de A β_{1-40} 18 dias após o início do protocolo de exercício físico. Vinte e quatro horas após o término das 4 semanas de exercício físico em esteira, os animais foram sacrificados por decapitação e seus hipocampos foram isolados e utilizados para determinar os níveis de BDNF e o imunoconteúdo de mTOR (**Figura 7A**). Um segundo grupo de animais foi usado para avaliação do desempenho cognitivo e análise da proliferação de células hipocampais. Os camundongos foram submetidos ao exercício físico em esteira durante 4 semanas, submetidos à administração de A β_{1-40} 18 dias após o início do protocolo de exercício físico e BrdU (100 mg/kg, i.p.) em intervalos de 12 h durante 3 dias consecutivos após o final do exercício físico em esteira. Vinte e quatro horas após a última injeção de BrdU, os camundongos foram submetidos à tarefa de localização do objeto e posteriormente sacrificados por perfusão transcardíaca. As secções do encéfalo foram então processadas para imuno-histoquímica com BrdU (**Figura 7B**). Um terceiro grupo de animais foi usado para avaliação de comportamento tipo-depressivo e análise da sobrevivência das células do hipocampo. Os camundongos submetidos à administração de BrdU (100 mg/kg, i.p.) em intervalos de 12 horas durante 3 dias consecutivos antes do início do protocolo de exercício físico em esteira (4 semanas). A β_{1-40} foi administrada 18 dias após o início do protocolo de exercício físico e os animais foram submetidos ao TNF e TCA 24 h após o término do protocolo de exercício físico. Os camundongos foram então sacrificados por perfusão transcardíaca e os cérebros foram processados para imuno-histoquímica com BrdU (**Figura 7C**).

Figura 7- Linha do tempo experimental



Legenda: Para todos os experimentos, os camundongos dos grupos exercitados foram submetidos a 4 semanas de corrida em esteira (5 dias / semana, 40 min / dia). Dezoito dias após o início do protocolo de exercício físico os camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/ animal/ i.c.v.) ou veículo por via i.c.v. Vinte e quatro horas após o último dia de exercício físico os camundongos foram eutanasiados, os hipocampus foram dissecados e utilizados para avaliar os níveis de BDNF maduro por ELISA e o imunocônteúdo de mTOR por Western Blot (A). Para análise da proliferação celular, administrou-se BrdU (100 mg / kg, i.p.) a cada 12 h durante três dias consecutivos após o final do protocolo de exercício físico em esteira. Vinte e quatro horas após a última injeção de BrdU, os camundongos foram submetidos à tarefa de localização do objeto e, subsequentemente foram transcardialmente perfundidos. As secções do encéfalo foram então processadas para imuno-histoquímica para BrdU para avaliar o número de células recém-nascidas (células BrdU+) no GD do hipocampo (B). Para análise de sobrevivência de células recém-geradas, os animais foram administrados com BrdU (100 mg / kg, i.p.) de 12 em 12 h durante três dias consecutivos antes do início do protocolo de exercício físico. Vinte e quatro horas após o último dia de exercício físico (isto é, 4 semanas após as injeções de BrdU) os animais foram submetidos a testes comportamentais (TNF e TCA) e subsequentemente sacrificados por perfusão transcardíaca. Os hipocampus foram então processados para imunohistoquímica para BrdU para avaliar a sobrevivência de células do GD recém-geradas (ou seja, o número de células que incorporaram BrdU e ainda estavam presentes no GD 4 semanas depois) (C). TCA – teste do campo aberto; TNF – teste do nado forçado; TRO – teste de realocação de objeto.

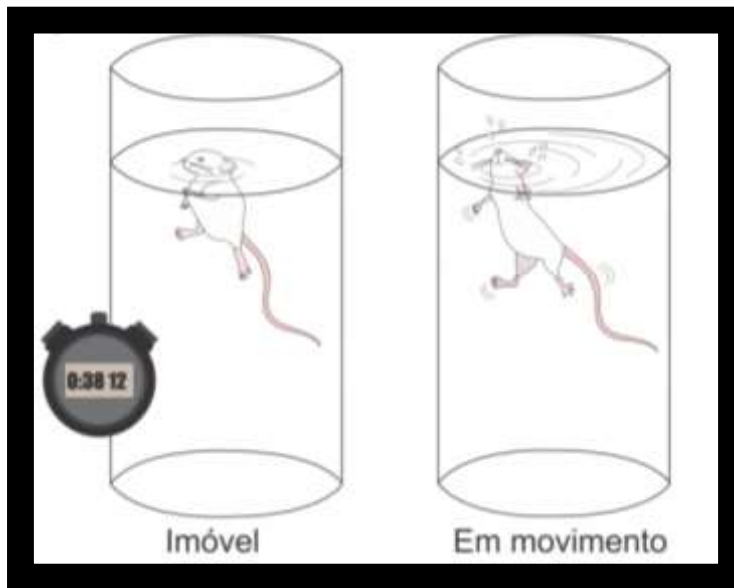
I.2.3. Protocolo de Exercício Físico

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: 1- sedentários; 2- exercitados em esteira; 3- sedentários / A β ₁₋₄₀; 4- exercitados em esteira / A β ₁₋₄₀. Os animais dos grupos exercitados foram submetidos a um período de 4 semanas de exercício físico aeróbico composto por 5 sessões de corrida por semana (segunda a sexta-feira) em aparelho de esteira (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Cada sessão de corrida durou 40 min/dia. A velocidade da esteira foi progressivamente aumentada (em incrementos de 2 m/min por semana) durante o período de 4 semanas, iniciando em 6 m/min no início do protocolo e concluindo com 12 m/min ao final do protocolo. A corrida em esteira ocorreu sempre entre as 13:00 e as 15:00 horas. Os camundongos do grupo controle (sedentários) foram colocados em uma esteira travada pelo mesmo período de tempo. Os animais dos grupos “exercitados” foram monitorados para garantir sua segurança e o treinamento. Este protocolo de exercício físico em esteira foi adaptado de Liu *et al.* (2009).

I.2.4. Teste do Nado Forçado (TNF)

O método original descrito por Porsolt *et al.* (1977) baseia-se na observação de que quando os animais são submetidos a uma situação inescapável, após um período de agitação inicial, adotam uma postura de imobilidade. Agentes antidepressivos diminuem o tempo em que os animais permanecem imóveis. O camundongo é considerado imóvel quando flutua ou faz apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água. O tempo de imobilidade foi cronometrado durante 6 minutos em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água, à temperatura de 25°C \pm 1°C (**Figura 8**).

Figura 8- Teste do nado forçado

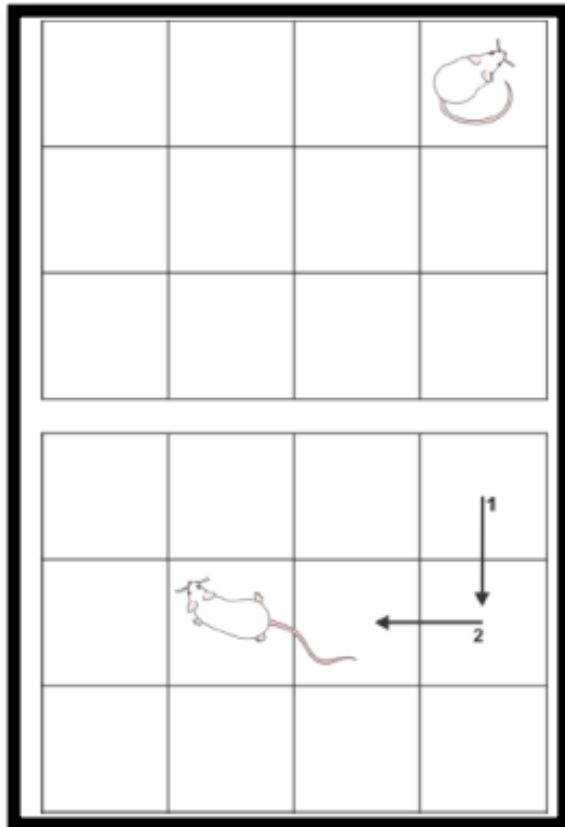


Legenda: O animal é colocado dentro de um cilindro com água, no qual o animal executa movimentos necessários somente para manter a cabeça acima da água. O tempo de imobilidade é cronometrado por 6 min. Fonte: imagem cedida por Ágatha Oliveira.

I.2.5. Teste de campo aberto (TCA)

A atividade locomotora foi avaliada no TCA, como descrito anteriormente (Rodrigues *et al.*, 2002). O aparelho consiste em uma caixa de madeira medindo 60 cm de largura x 40 cm de profundidade x 50 cm de altura. O piso da arena foi dividido em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados com todas as patas (cruzamentos), número de episódios de autolimpeza, levantamentos, o número de bolos fecais e o tempo gasto no centro do aparelho foram registrados durante uma sessão de 6 minutos. O aparato foi limpo com etanol a 10% entre os testes (**Figura 9**).

Figura 9- Teste do campo aberto



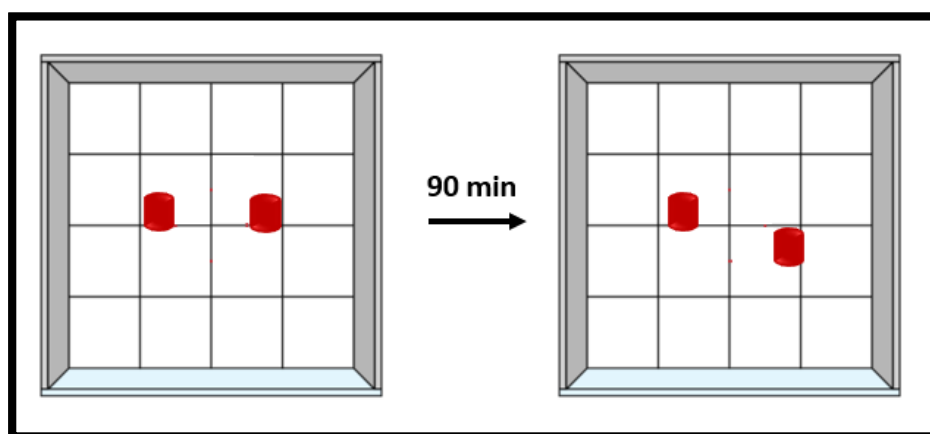
Legenda: Os animais são colocados dentro de uma arena quadriculada e o número de cruzamentos com as 4 patas é registrado. Fonte: imagem cedida por Ágatha Oliveira.

I.2.6. Teste de realocação de objeto

A memória espacial foi avaliada usando o teste de realocação de objeto. Essa tarefa é baseada na tendência espontânea de roedores, previamente expostos a dois objetos idênticos, para posteriormente explorar um dos objetos por um período mais longo de tempo quando este é movido para um novo local e quando comparado ao outro objeto não deslocado (Murai *et al.*, 2007). O aparato experimental utilizado neste estudo foi uma caixa de madeira de campo aberto (60 cm de largura x 40 cm de profundidade x 50 cm de altura). Retângulos de plástico idênticos (4 cm de altura x 4,5 cm de largura) foram usados como objetos. O protocolo utilizado baseou-se no método previamente descrito por dos Santos *et al.* (2013). Os camundongos foram colocados no centro do aparelho com dois objetos idênticos colocados a 7 cm das paredes do campo aberto. Os animais exploraram os dois objetos por 3 min, e o tempo de exploração foi registrado com um cronômetro por um investigador cego para a identidade dos animais. Considerou-se que os camundongos exploravam sempre que cheiravam, mexiam ou olhavam para cada

objeto a uma distância de não mais do que 1 cm do respectivo objeto. Após a fase de treinamento, os camundongos foram removidos do aparato por um intervalo de 90 min. Após esse intervalo, um objeto foi movido no aparato. O tempo gasto por cada animal para explorar os objetos em locais novos (deslocado) e antigos (familiares) foi registrado por 3 min. Os locais dos objetos foram contrabalançados entre os grupos. Como dado do desempenho cognitivo, o índice de localização de objetos foi calculado como descrito anteriormente por Dos Santos *et al.* (2013): $(T \text{ deslocado} \times 100) / (T \text{ deslocado} + T \text{ familiar})$, onde T deslocado é o tempo gasto explorando o objeto deslocado e T familiar é o tempo gasto explorando o objeto não deslocado (**Figura 10**).

Figura 10 - Teste de realocação de objeto



Legenda: Os animais exploraram dois objetos por 3 min e a exploração foi registrada. Após intervalo de 90 min, um objeto foi movido para um novo local. O tempo gasto por cada animal explorando os objetos em locais novos (deslocado) e antigos (familiares) foi registrado por 3 min. Fonte: do autor.

I.2.7. Níveis de BDNF maduro

Vinte e quatro horas após o término do protocolo de exercício físico, os camundongos foram eutanasiados. Os hipocampus foram rapidamente dissecados em gelo e congelados com nitrogênio líquido antes do armazenamento a -80°C até o uso. As amostras foram homogeneizadas em tampão de lise (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10% glicerol e coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). A quantificação de proteínas totais foi determinada em todos os homogenatos utilizando albumina de soro bovino como padrão (Lowry *et al.*, 1951). O sangue total foi coletado e centrifugado, e o soro foi armazenado a -80°C para posterior análise. O BDNF também foi mensurado no soro, pois os níveis desta neurotrofina são

mais elevados no soro do que no plasma, tanto em humanos quanto em roedores (Karege *et al.*, 2005). Os níveis hipocámpais e séricos de BDNF maduro foram mensurados por ensaio imunoadsorvente ligado à enzima de captura de antígeno (ELISA) usando um kit Promega BDNF Emax® ImmunoAssay System ELISA (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante e como descrito anteriormente (Da Fonseca *et al.*, 2018). Os níveis de BDNF foram expressos como pg BDNF / mg de proteína (hipocampo) ou pg BDNF / ml (soro).

I.2.8. Imunodeteção de proteínas por Western Blot

O imunoc conteúdo de mTOR no hipocampo foi determinado por imunodeteção por Western Blot, como previamente descrito (Moretti *et al.*, 2013). Os hipocampus foram dissecados, mecanicamente homogeneizados em 500 µl de tampão de amostra (200 mM Tris, 40 mM EDTA, 4% SDS, pH 6,8) e imediatamente fervidos durante 5 min. A amostra foi diluída em uma solução contendo 1: 4 v / v; 40% de glicerol, Tris 50 mM, azul de bromofenol e β-mercaptoetanol, que foram adicionados a cada amostra a uma concentração final de 5%. As proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliácridamida (concentração 10%) contendo SDS (SDS-PAGE; miniVE Vertical Eletroforesis System™, GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EUA) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose (Mini-PROTEAN Tetra cell Eletroforesis System, Bio-Rad, Hercules, CA). Para verificar a eficiência do processo de transferência as membranas foram coradas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%. Após este processo, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora com leite em pó desnatado 5% TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). As membranas foram bloqueadas (1 h) com leite desnatado a 5% em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Níveis totais (1:1000; Cell Signaling®, MA, EUA) e forma fosforilada (Ser²⁴⁴⁸) de mTOR (1: 1000; Cell Signaling®, MA, EUA) e β-actina (1:1000; Cell Signaling®, MA, EUA) foram detectadas incubando membranas durante a noite com anticorpos primários específicos (produzidos em coelho) diluídos em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-10 a 0,1%, pH 7,5) contendo albumina a 2,5%. As membranas foram então incubadas com um anticorpo secundário ligado a peroxidase anti-coelho (1:5000; Cell Signaling®, MA, EUA) durante 1 h e as reações desenvolvidas por quimioluminescência (LumiGLO, Cell Signaling, Beverly, MA, EUA). Após todos os passos de bloqueio e incubação, as membranas foram lavadas três vezes (5 minutos cada) com TBS-T. A densidade óptica

(DO) foi quantificada utilizando o Image Lab Software® 4.1 (Bio-Rad Laboratories). Os níveis de fosforilação de mTOR foram determinados como uma razão entre o DO da banda fosforilada e a DO da banda total. O imunoc conteúdo de mTOR foi determinado como uma razão entre a DO da banda de mTOR e a da banda de β -actina. Os resultados são expressos em porcentagens em comparação ao grupo controle (100%).

I.2.9. Processamento de tecido para imuno-histoquímica

Os camundongos foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) e transcardialmente perfundidos com cloreto de sódio a 0,9% (NaCl) seguido por paraformaldeído a 4% (PFA). Os cérebros foram removidos e deixados em 4% de PFA durante a noite a 4°C, e depois transferidos para solução de sacarose 30%, posteriormente congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até o seccionamento. Os cérebros foram seccionados coronalmente em um criostato a uma espessura de 30 μ m. Para detectar células positivas para BrdU, as secções foram incubadas durante 30 min em HC1 1 M a 67°C para desnaturar a dupla hélice de DNA e subsequentemente incubadas em solução de bloqueio (5% de soro de cavalo normal em 0,1 M de PBS contendo 0,25% Triton X-100 durante 1 h). Após o bloqueio, as secções foram incubadas com um anticorpo primário de camundongo monoclonal de rato contra BrdU (1:100; Abcam, São Paulo, SP, Brasil) em solução bloqueadora a 2% a 4°C por 36 h. As secções foram então incubadas com o anticorpo secundário anti-rato conjugado com Cy3 (1:200; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA). Todas as secções foram montadas em lâminas de vidro e cobertas com uma solução de montagem *fluorguard antifade* (Sigma Chemical Company).

I.2.10. Quantificação Morfológica

Todas as secções contendo o GD e abrangendo todo o eixo dorsal/ventral do hipocampo (de 1,34 mm posterior ao bregma até 3,52 mm bregma posterior) foram usadas para a análise de células positivas para BrdU, resultando em 9 a 10 secções do GD por animal. As secções contendo a parte dorsal (de bregma-1,34 a -2,18; aproximadamente, cinco secções coronais por cérebro) e ventral do GD (de bregma -2,30 a -3,16; aproximadamente, cinco secções coronais por cérebro) foram também avaliadas separadamente para determinar o número de células positivas para BrdU nos GD dorsais e ventrais (Xiong *et al.*, 2017). A quantificação de células positivas para BrdU foi realizada em lâminas codificadas usando um microscópio Olympus (Olympus BX41, Center Valley, PA, EUA) com objetivas de $\times 10$ e $\times 40$. O software Image Q-capture Pro

5.1 e uma câmera Q Câmera de 3,3 megapixels (Q-imaging Inc, Surrey, BC, Canadá) foram usados para captura das imagens. Uma abordagem estereológica modificada foi usada para estimar o número total de células marcadas na ZSG do GD hipocampal como descrito anteriormente Gil-Mohapel *et al.* (2013). Para cada seção, todas as células positivas para BrdU presentes dentro de dois a três diâmetros nucleares abaixo da camada de células granulares foram contadas. Dessa maneira o cálculo foi feito através da multiplicação da média do número de células BrdU+ marcadas no GD total pelo número total de seções de 30 μ m de espessura contidos no GD inteiro (60 fatias), GD dorsal (30 fatias), ou GD ventral (30 fatias) I.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão apresentados como média + erro padrão da média (S.E.M.). As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pela análise de variância de duas vias (ANOVA), seguida pelo teste *post-hoc* de Duncan, exceto nos resultados obtidos na tarefa de localização do objeto, que foram analisados por teste t de Student para determinar se o índice de localização foi diferente do desempenho casual (50%). Um valor de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

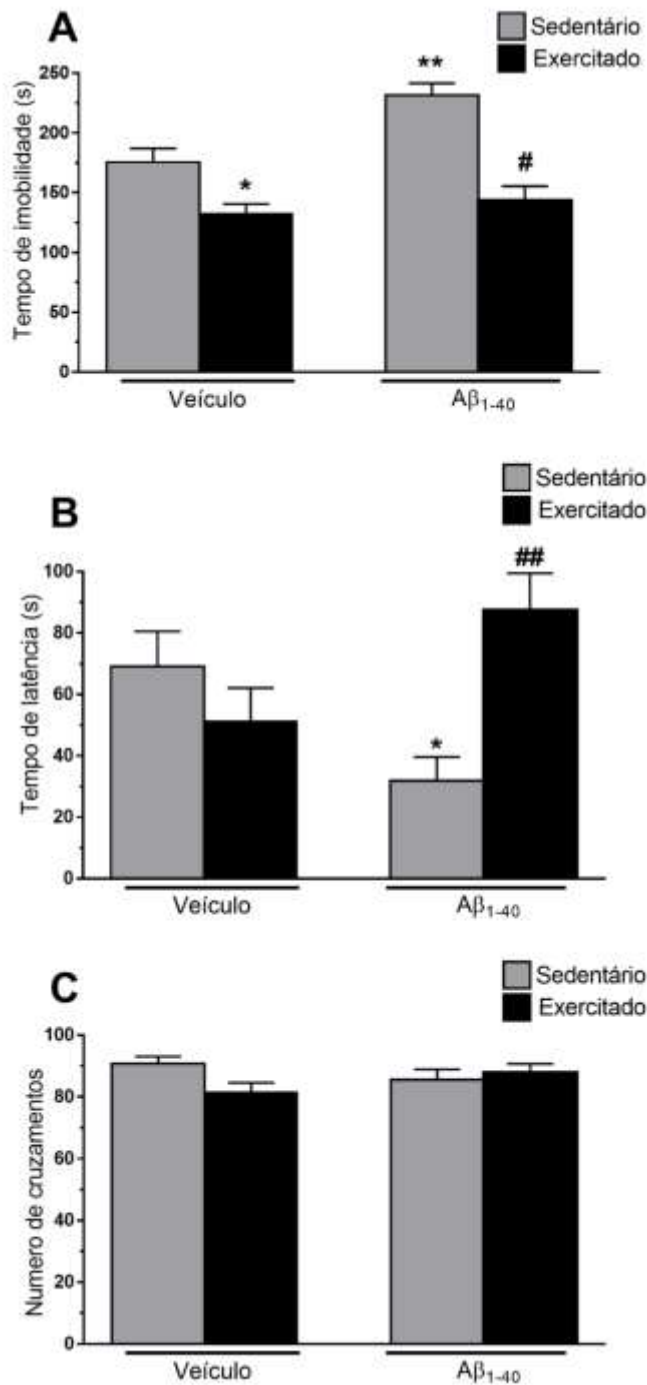
I.4. RESULTADOS

I.3.1. Efeito do exercício físico em esteira no TNF, TCA e desempenho cognitivo

Os resultados apresentados na **Figura 11A-B** mostram a influência do protocolo de exercício físico em esteira (4 semanas, 40 min / dia) ou administração de $A\beta_{1-40}$ na resposta comportamental de camundongos no TNF. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do exercício físico em esteira ($[F(1,28) = 39,88, p < 0,01]$), da administração de $A\beta_{1-40}$ ($[F(1,28) = 10,39, p < 0,01]$), e uma interação significativa entre $A\beta_{1-40} \times$ exercício físico em esteira ($[F(1,28) = 4,74, p < 0,05]$). A análise de *post hoc* indicou que animais que submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ tiveram aumento significativo no tempo de imobilidade no TNF em comparação com grupo controle ($p < 0,01$). Além disso, este protocolo de exercício físico reduziu o tempo de imobilidade no TNF quando comprado ao grupo controle ($p < 0,05$) e $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,05$), indicando que este protocolo de exercício físico produziu um efeito tipo-antidepressivo em camundongos e preveniu o comportamento tipo-depressivo em animais que receberam administração de $A\beta_{1-40}$ (**Figura 11A**). Em relação ao tempo de latência para iniciar o período de imobilidade no TNF ilustrado na **Figura 11B**, a ANOVA de duas vias revelou uma interação significativa entre $A\beta_{1-40} \times$ exercício físico em esteira $[F(1,28) = 13,55, p$

< 0,01], mas nenhum efeito principal significativo de $A\beta_{1-40}$ administração [F (1,28) = 0,004, p = 0,95] e exercício físico em esteira [F (1,28) = 3,60, p = 0,07]. A **Figura 11C** mostra que a administração de $A\beta_{1-40}$ e / ou exercício físico em esteira não apresentou efeito significativo sobre a atividade locomotora global, avaliada no TCA (tratamento $A\beta_{1-40}$ [F (1,28) = 0,04, p = 0,83]; F (1,28) = 1,42, p = 0,24]; administração de $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira [F (1,28) = 3.84, p = 0,60]).

Figura 11- Efeitos da corrida em esteira no comportamento tipo-depressivo induzido por $A\beta_{1-40}$ no TNF



Legenda: Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e / ou exercício físico em esteira no tempo de imobilidade (A) e tempo de latência (B) no TNF e no número de cruzamentos no TCA (C) (n = 8 animais / grupo). Barras representam médias + S.E.M. * p < 0,05, ** p < 0,01 quando comparado com o grupo tratado com veículo; #p < 0,05, ## p < 0,01 em comparação com o grupo sedentário administrado com $A\beta_{1-40}$ (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

Os resultados apresentados na **Figura 12A-D** mostram os efeitos do protocolo de exercício físico em esteira e / ou administração de peptídeos $A\beta_{1-40}$ em parâmetros avaliados no TCA, como tempo gasto no centro do aparato, número de episódios de autolimpeza, número de bolos fecais e número de episódios de levantamentos e. Em relação ao tempo gasto no centro do TCA (**Figura 12A**), a ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo do exercício físico em esteira ($[F(1,28) = 6,61, p < 0,05]$), pois os camundongos submetidos ao exercício físico permaneceram mais tempo no centro do aparato em comparação com camundongos sedentários ($p < 0,05$). Um efeito principal significativo da administração do $A\beta_{1-40}$ também foi detectado ($[F(1,28) = 156,50, p < 0,01]$), uma vez que camundongos tratados com $A\beta_{1-40}$ permaneceram menos tempo no centro do aparato em comparação com o grupo controle ($p < 0,01$), sugerindo que $A\beta_{1-40}$ resultou no desenvolvimento de comportamento tipo-ansioso. No entanto, não foi observada uma interação significativa entre $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira ($[F(1,28) = 0,28, p = 0,66]$).

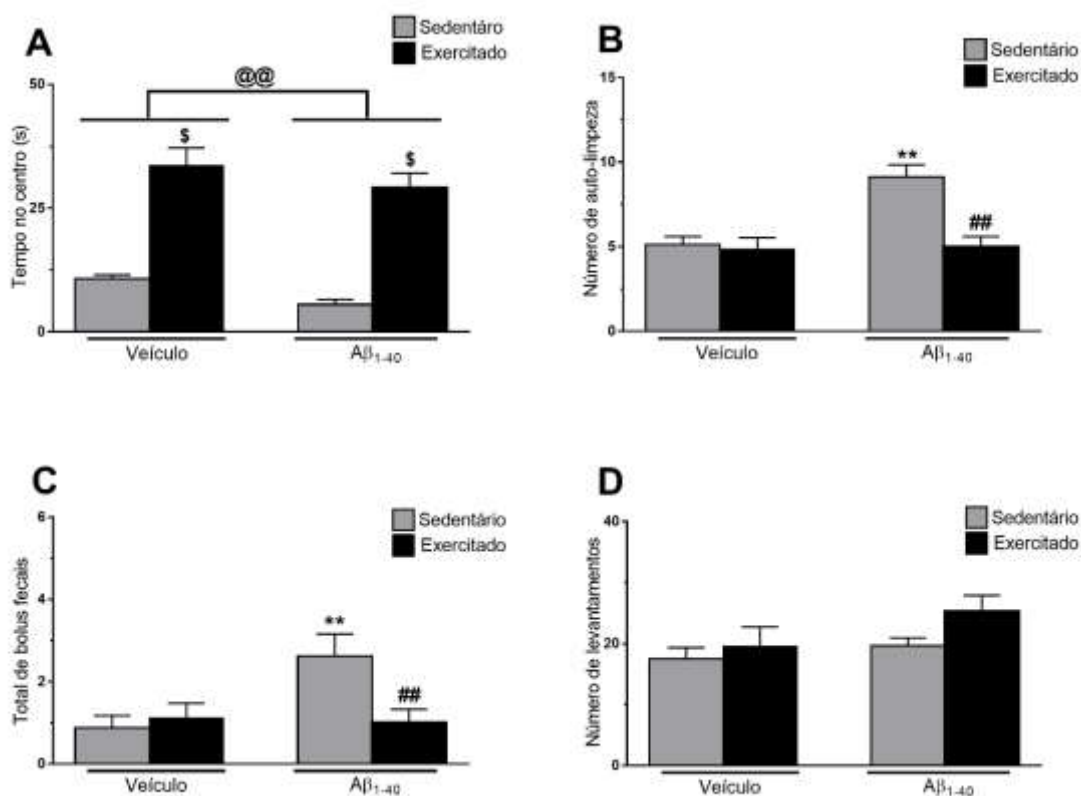
No que diz respeito ao número de episódios de autolimpeza, a ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do exercício físico em esteira ($[F(1,28) = 12,37, p < 0,01]$) e administração de $A\beta_{1-40}$ ($[F(1,28) = 11,00, p < 0,01]$), bem como uma interação significativa de $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira ($[F(1,28) = 9,70, p < 0,01]$) (**Figura 12B**). Posteriormente, a análise *post-hoc* revelou um aumento significativo no número de episódios de autolimpeza em camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,01$), um efeito que foi completamente abolido pelo protocolo de exercício físico utilizado ($p < 0,01$), evidenciando o efeito tipo-antidepressivo do exercício físico em esteira.

Em relação ao número de bolos fecais, a ANOVA de duas vias revelou efeito principal significativo da administração do $A\beta_{1-40}$ ($[F(1,28) = 4,40, p < 0,05]$) e um efeito significativo da interação entre $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira ($[F(1,28) = 5,85, p < 0,05]$), mas não do exercício físico em esteira ($[F(1,28) = 3,15, p = 0,08]$) (**Figura 12C**). A análise *post-hoc* revelou um aumento significativo no número de bolos fecais nos camundongos que receberam a administração de $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,01$), um efeito que foi significativamente abolido pelo exercício físico em esteira ($p < 0,01$), mais uma vez destacando o efeito ansiolítico deste protocolo de exercício físico.

Em relação ao número de episódios de levantamentos (**Figura 12D**), a administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico em esteira não alterou o número destes

episódios. Não foram mostrados efeitos significativos da administração de $A\beta_{1-40}$ [$F(1,28) = 2,80, p = 0,10$]; exercício físico em esteira [$F(1,28) = 2,75, p = 0,16$]; administração de $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira [$F(1,28) = 0,56, p = 0,45$].

Figura 12- Efeitos da corrida em esteira no comportamento tipo-ansioso induzido por $A\beta_{1-40}$ no TCA

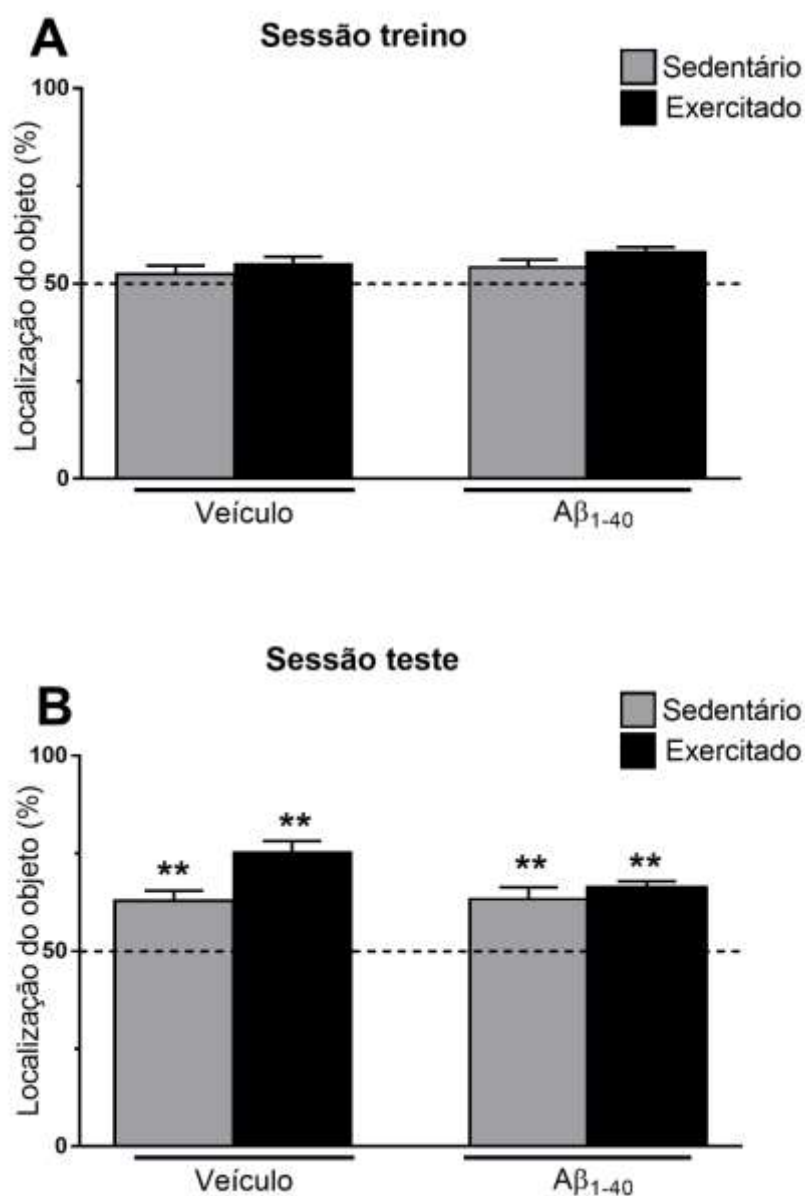


Legenda: Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e / ou exercício físico no tempo gasto no centro do aparato de campo aberto (A), número de episódios de autolimpeza (B), número de bolos fecal (C) e número de episódios de levantamentos (D) no TCA ($n = 8$ animais / grupo). Barras representam médias + S.E.M. @@ $p < 0,01$ entre camundongos tratados com $A\beta_{1-40}$, comparados com grupo veículo (efeito principal significativo da administração de $A\beta_{1-40}$); \$ $p < 0,05$ em comparação com camundongos sedentários (efeito principal significativo do exercício físico); ** $p < 0,01$ em comparação com os camundongos tratados com veículo; ## $p < 0,01$ comparado com grupo sedentário (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

Os resultados descritos na **Figura 13A-B** mostram os efeitos do exercício físico em esteira no desempenho cognitivo avaliado na tarefa de realocação do objeto em grupo independente de animais. Em relação ao índice de localização do objeto durante a sessão de treinamento, a ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito principal significativo do exercício físico em esteira ([$F(1,27) = 0,13, p = 0,72$]), da administração do $A\beta_{1-40}$ ([F

(1,27) = 0,31, $p = 0,58$]) e da interação $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira ([$F(1,27) = 0,05$, $p = 0,82$]). De fato, todos os animais, independentemente das manipulações a que foram expostos, dispenderam aproximadamente 50% do tempo explorando cada objeto e, portanto, não mostraram preferência por nenhum dos objetos e suas respectivas localizações (**Figura 13A**). Por outro lado, durante a sessão de teste (**Figura 13B**), todos os grupos experimentais ficaram mais tempo explorando o objeto que foi movido para um novo local quando comparado com o tempo explorando o objeto não deslocado, como indicado por um aumento significativo no índice de localização do objeto ($p < 0,01$). Este resultado indica que todos os animais foram capazes de reconhecer o objeto deslocado (sedentário: $t = 4,96$, $df = 7$, $p < 0,01$; exercitado: $t = 9,27$, $df = 6$, $p < 0,01$; administração $A\beta_{1-40}$: $t = 4,28$, $df = 7$, $p < 0,01$; $A\beta_{1-40}$ x exercício físico: $t = 9,17$, $df = 7$, $p < 0,01$ quando comparado com a exploração de 50%).

Figura 13- Efeitos da exposição $A\beta_{1-40}$ e do exercício físico em esteira na memória espacial dependente do hipocampo na tarefa de realocação do objeto



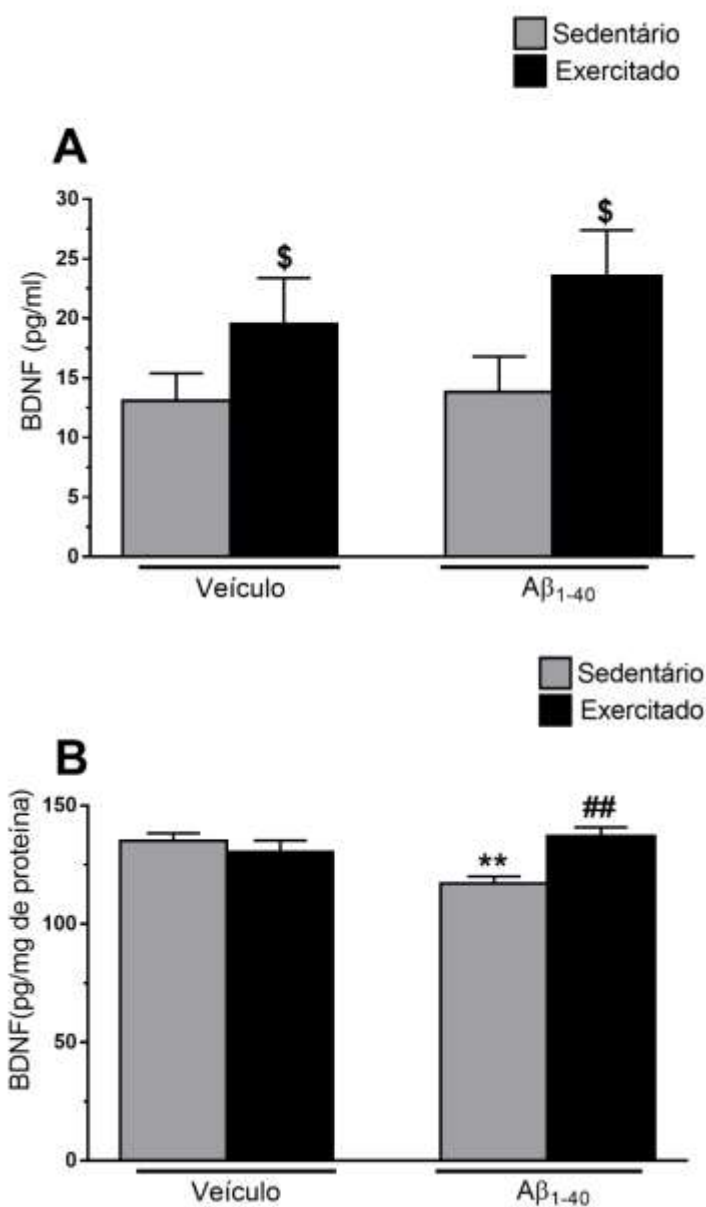
Legenda: Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e / ou exercício físico sobre o índice de localização de objeto durante a sessão de treinamento (A) e sessão de teste (realizada após um intervalo de 90 min) (B) (n = 7 animais / grupo). ** p < 0.01 comparado com 50% (teste t de Student).

1.3.2. Efeito do exercício físico em esteira nos níveis de BDNF e no imunoconteúdo de mTOR

A **Figura 15A-B** ilustra os efeitos do exercício físico em esteira e da administração de $A\beta_{1-40}$ nos níveis de BDNF no soro e hipocampo de camundongos (painéis A e B, respectivamente). Em relação aos níveis séricos de BDNF, a ANOVA de

duas vias revelou um efeito principal significativo do exercício físico em esteira [F (1,17) = 6,22, $p < 0,05$], pois os camundongos exercitados apresentaram níveis séricos de BDNF mais elevados do que os camundongos sedentários ($p < 0,05$). No entanto, nenhum efeito principal significativo da administração de $A\beta_{1-40}$ [F (1,17) = 0,52, $p = 0,47$] e da interação entre administração de $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira [F (1,17) = 0,24, $p = 0,62$] foram detectados. No hipocampo, a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo da interação entre administração $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira [F (1,25) = 10,04, $p < 0,01$], mas nenhum efeito principal significativo da administração de $A\beta_{1-40}$ [F (1,25) = 2,40, $p = 0,13$] e exercício físico em esteira [F (1,25) = 4,06, $p = 0,054$]. Além disso, a análise *post-hoc* revelou que a exposição a $A\beta_{1-40}$ diminuiu significativamente os níveis de BDNF no hipocampo em comparação com os animais do grupo controle ($p < 0,01$), e que o protocolo de exercício físico utilizado foi capaz de impedir essa alteração ($p < 0,01$) (**Figura 15B**).

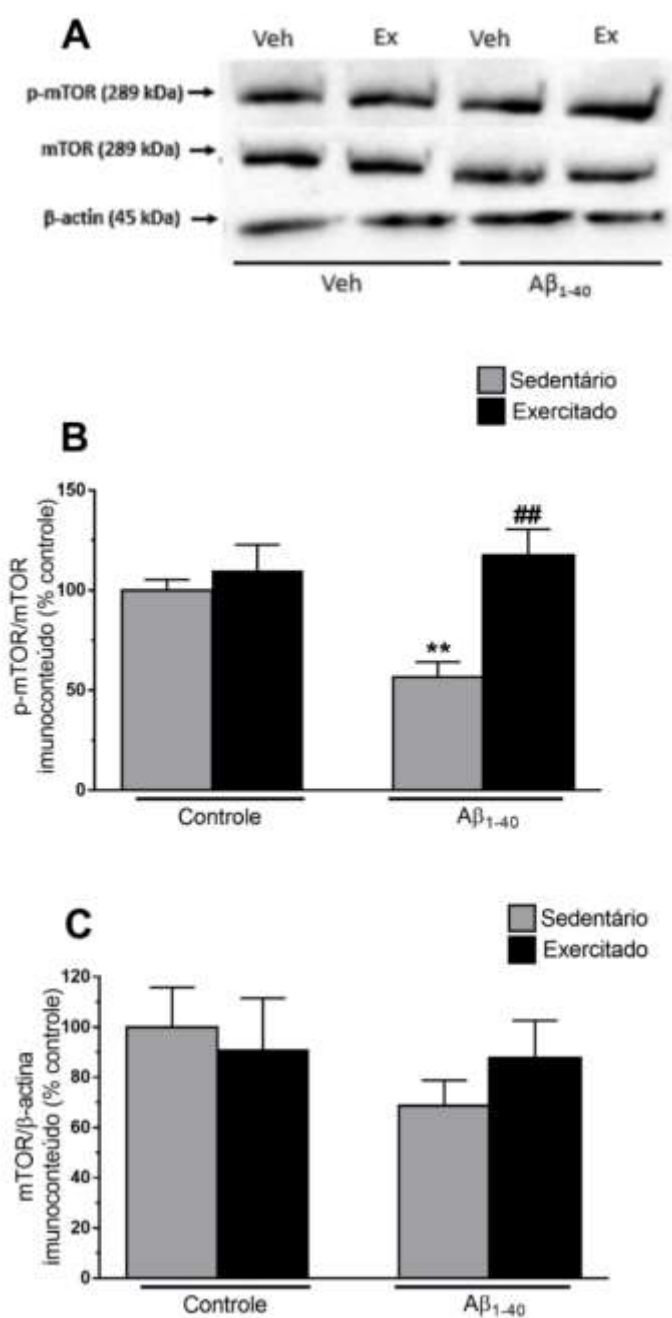
Figura 14- Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico em esteira nos níveis de BDNF maduro no soro e no hipocampo



Legenda: Níveis de BDNF no soro (A) e no hipocampo (B) (n = 5-8 animais / grupo). Os resultados são expressos como média + S.E.M. \$ p < 0,05 em comparação com camundongos sedentários (efeito principal significativo do exercício físico); ** p < 0,01 em comparação com camundongos tratados com veículo; ## p < 0,01 em comparação com os camundongos sedentários submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

A **Figura 15** ilustra os efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e / ou exercício físico em esteira no imunoconteúdo de p-mTOR e mTOR total no hipocampo. A ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo do exercício físico em esteira [$F(1,28) = 11,59, p < 0,01$] e da interação $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira [$F(1,28) = 6,09, p < 0,05$], mas não mostrou um efeito significativo da administração de $A\beta_{1-40}$ [$F(1,28) = 2,95, p = 0,09$] em relação à p-mTOR / mTOR. A análise *post hoc* indicou que os animais tratados com $A\beta_{1-40}$ exibiram diminuição da fosforilação de mTOR no hipocampo ($p < 0,01$), um efeito que foi prevenido pelo exercício físico ($p < 0,01$), como mostra a **Figura 15B**. Em relação aos níveis totais de mTOR, não houve efeitos principais significativos da administração de $A\beta_{1-40}$ [$F(1,28) = 1,19, p = 0,28$] e do exercício físico em esteira [$F(1,28) = 0,09, p = 0,76$] e interação entre administração de $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira [$F(1,28) = 0,78, p = 0,38$] (**Figura 15C**), indicando que a exposição ao $A\beta_{1-40}$ e / ou 4 semanas de corrida em esteira não impactaram o nível total dessa proteína.

Figura 15- Efeitos da administração de A β 1-40 e/ou protocolo de exercício físico em esteira no imunoconteúdo de p-mTOR e mTOR no hipocampo



Legenda: Imunoconteúdos representativos de p-mTOR, mTOR e β -actina (controle de carga) (A). Análise quantitativa da fosforilação de mTOR (determinada pela razão p-mTOR/mTOR) (B) e do imunoconteúdo de mTOR total (determinado pela razão mTOR/ β -actina) no hipocampo de camundongos sedentários e exercitados submetidos à administração de veículo ou A β 1-40 (n = 8 animais/grupo). Os resultados são expressos como porcentagem de controle (grupo sedentário, tratado com veículo) + S.E.M. ** p < 0,01 em comparação com camundongos tratados com tratados veículo; ## p < 0,01 comparado com o sedentário administrados com A β 1-40 (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

I.3.3. Efeito do exercício físico em esteira na proliferação e sobrevivência de células do hipocampo

A **Figura 16** investigou a influência da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico em esteira na proliferação de células do hipocampo. A ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos da administração de $A\beta_{1-40}$ [$F(1,21) = 46,50, p < 0,01$] e exercício físico em esteira [$F(1,21) = 417,55, p < 0,01$], bem como interação significativa da administração de $A\beta_{1-40} \times$ exercício físico em esteira [$F(1,21) = 5,79, p < 0,05$]. A análise *post-hoc* revelou que o protocolo de exercício físico aumentou significativamente o número de células positivas para BrdU presentes ao longo de todo o GD do hipocampo quando comparado ao grupo controle (sedentário) ($p < 0,01$) (**Figura 16B**). Além disso, a administração de $A\beta_{1-40}$ causou uma redução no número de células positivas para BrdU em todo o GD ($p < 0,01$), efeito que foi prevenido pelo exercício físico ($p < 0,01$).

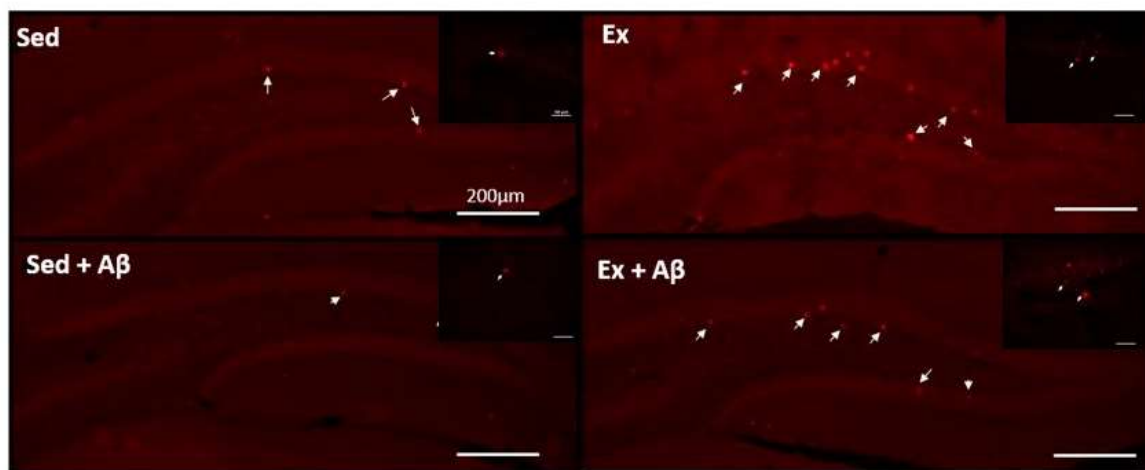
A proliferação celular também foi analisada individualmente no GD ventral e dorsal. Em relação à proliferação no GD ventral, a ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos da administração de $A\beta_{1-40}$ [$F(1,20) = 24,08, p < 0,01$] e exercício físico em esteira [$F(1,20) = 300,29, p < 0,01$], bem como na interação entre a administração de $A\beta_{1-40} \times$ exercício físico em esteira [$F(1,20) = 8,87, p < 0,01$]. As análises *post-hoc* revelaram diferenças semelhantes às obtidas em todo o GD, ou seja, o exercício físico aumentou significativamente o número de células positivas para BrdU no GD ventral em comparação com o grupo controle (camundongos sedentários tratados com veículo) ($p < 0,01$), enquanto o tratamento com $A\beta_{1-40}$ diminuiu o número de células proliferativas nesta região do GD ($p < 0,01$). Camundongos tratados com $A\beta_{1-40}$ e submetidos ao exercício físico apresentaram um número de células proliferativas positivas para BrdU no GD ventral semelhante ao observado em camundongos exercitados tratados com veículo, indicando que o exercício físico em esteira foi capaz de prevenir o déficit induzido por $A\beta_{1-40}$ na proliferação celular no GD ventral (**Figura 16C**).

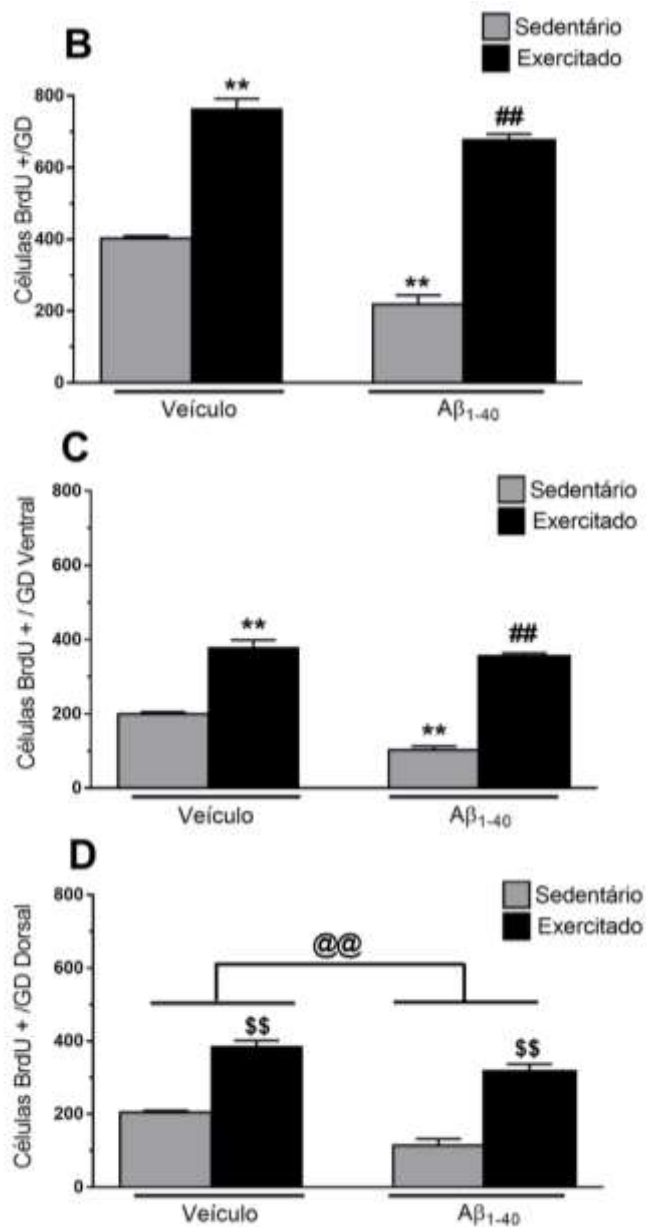
No GD dorsal, a ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo do tratamento $A\beta_{1-40}$ [$F(1,21) = 26,56, p < 0,01$], em camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$, mostrando uma redução significativa no número de células positivas para BrdU no GD dorsal quando comparadas com camundongos tratados com veículo ($p < 0,01$). Um efeito principal significativo do exercício físico em esteira [$F(1,21) = 154,67, p < 0,01$] também foi observado, pois os animais exercitados apresentaram um aumento significativo na proliferação celular no GD dorsal, em

comparação com os animais sedentários ($p < 0,01$). No entanto, não foi detectado efeito significativo da interação entre a administração de $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira [$F(1,21) = 0,47$, $p = 0,50$] em relação à proliferação celular no GD dorsal (**Figura 16D**).

Figura 16- Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou protocolo de corrida em esteira na proliferação de células do hipocampo

A





Legenda: (A) Fotomicrografias representativas dos efeitos do exercício físico em esteira sobre o número de células proliferativas positivas para BrdU presentes na ZSG do GD do hipocampo de camundongos tratados com veículo ou Aβ₁₋₄₀. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 10 x (barra de escala = 200 μm) ou 40 x (barra de escala = 50 μm; inserção). As células positivas são denotadas com setas brancas. Número total de células positivas para BrdU presentes ao longo da ZSG de todo o GD hipocampal (B), bem como porções ventral (C) e dorsal (D) (n = 6-7 animais / grupo). Os resultados estão representados como média + S.E.M. @@ p < 0,01 entre os grupos tratados com Aβ₁₋₄₀ e tratados com veículo (efeito principal significativo da administração de Aβ₁₋₄₀); \$\$ p < 0,01 em comparação com grupo sedentário (efeito principal significativo do exercício); ** p < 0,01 em comparação com camundongos tratados com veículo; ## p < 0,01 em comparação com o grupo sedentário administrados com Aβ₁₋₄₀ (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

Para avaliar os efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico em esteira na sobrevivência de células recém-geradas no GD do hipocampo, um grupo distinto de camundongos recebeu BrdU (100 mg / kg / i.p.) durante três dias antes do início do protocolo de exercícios e foram sacrificado 4 semanas depois, 24 h após a última sessão de exercício. A ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo da administração de $A\beta_{1-40}$ [$F(1,21) = 11.65, p < 0,01$], uma vez que os camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ apresentaram uma redução significativa no número de células positivas para BrdU sobreviventes presente ao longo de todo o GD do hipocampo em comparação com camundongos tratados com veículo ($p < 0,01$). Um efeito principal significativo do exercício físico em esteira também foi observado [$F(1,21) = 148,005, p < 0,01$], pois os camundongos submetidos ao protocolo de exercício físico apresentaram um aumento significativo no número de células positivas para BrdU sobreviventes quando comparado com o grupo de animais sedentários. ($p < 0,05$). No entanto, não foi detectada interação significativa entre $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira [$F(1,21) = 2,14, p = 0,15$] (**Figura 17B**).

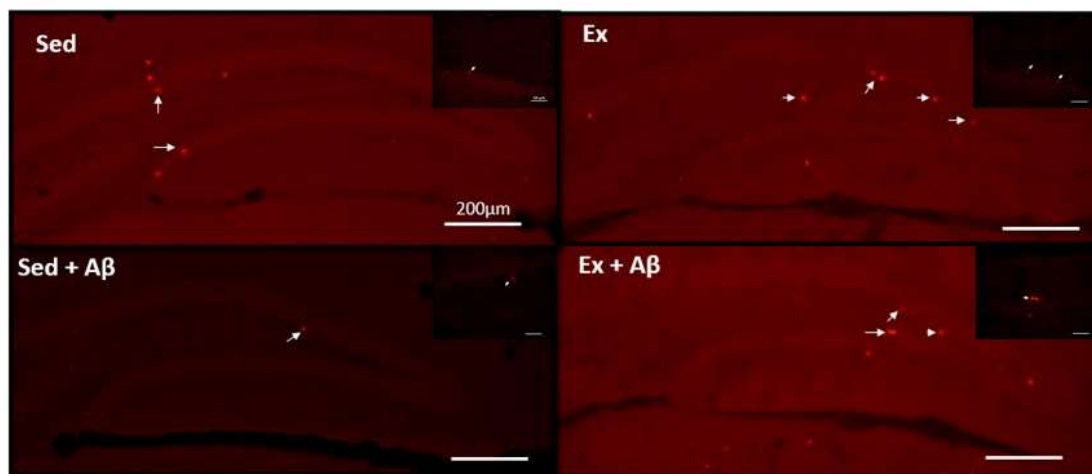
Além disso, a sobrevivência celular nas porções ventral e dorsal do GD do hipocampo também foram analisadas individualmente. No GD ventral (**Figura 17C**), a ANOVA de duas vias revelou efeitos principais significativos da administração de $A\beta_{1-40}$ [$F(1,20) = 17.30, p < 0,01$] e do exercício físico em esteira [$F(1,20) = 254.73, p < 0,01$], bem como uma interação significativa entre $A\beta_{1-40}$ e o exercício físico em esteira [$F(1,20) = 8,81, p < 0,01$]. Posteriormente, a análise *post hoc* indicou que o tratamento com $A\beta_{1-40}$ causou uma diminuição significativa na sobrevivência celular na porção ventral do GD ($p < 0,01$), efeito que foi prevenido pelo exercício físico ($p < 0,01$). Além disso, o exercício físico também foi capaz de aumentar o número de células positivas para BrdU sobreviventes no GD ventral ($p < 0,01$).

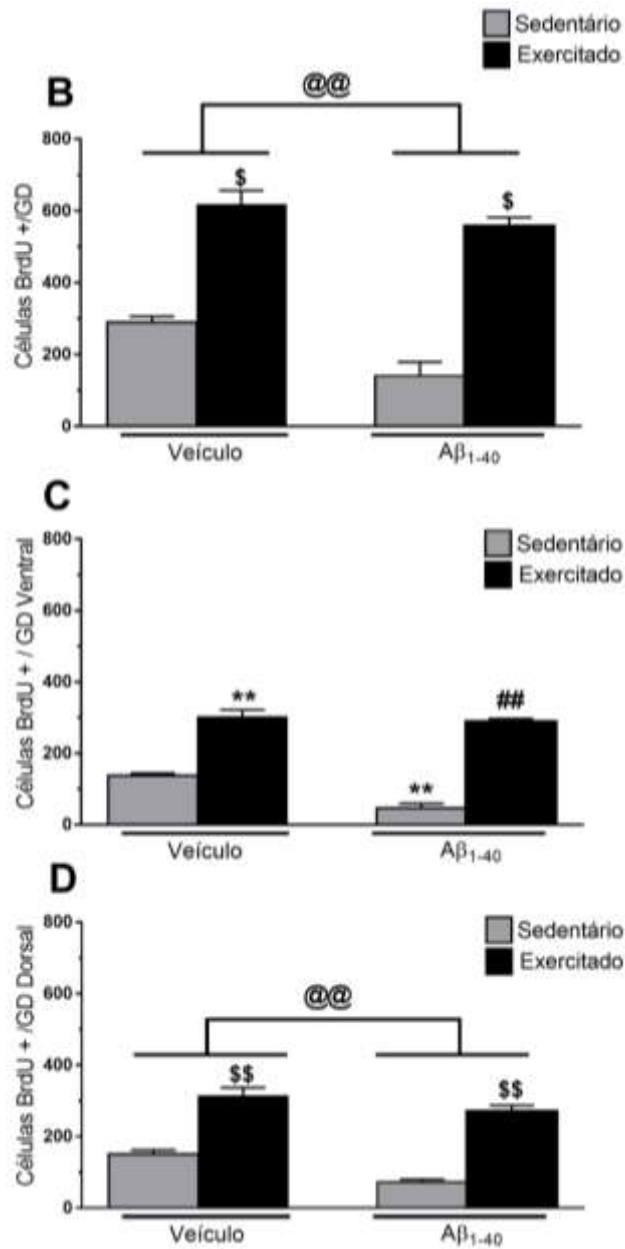
No GD dorsal (**Figura 17D**), a ANOVA de duas vias revelou um efeito da administração de $A\beta_{1-40}$ [$F(1,21) = 10,35, p < 0,01$], em camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ apresentando uma redução significativa no número de células positivas para BrdU sobreviventes no GD dorsal quando comparado com camundongos tratados com veículo ($p < 0,01$). Foi também observado um efeito principal significativo do exercício físico em esteira [$F(1,21) = 90,75, p < 0,01$], em camundongos submetidos ao protocolo de exercício físico, mostrando um aumento significativo no número de células sobreviventes positivas para BrdU no GD dorsal quando comparado com

camundongos sedentários ($p < 0,01$). No entanto, não houve interação significativa entre a administração de $A\beta_{1-40}$ x exercício físico em esteira [$F(1,21) = 0,76, p = 0,40$] em relação ao número de células sobreviventes positivas para BrdU presentes na porção dorsal do GD.

Figura 17- Efeitos da administração de A β 1-40 e / ou protocolo de corrida em esteira na sobrevivência de células recém-geradas no hipocampo

A





Legenda: (A) Fotomicrografias representativas dos efeitos do exercício físico em esteira sobre o número de células sobreviventes positivas para BrdU presentes na ZSG do GD hipocampal de camundongos tratados com veículo ou Aβ₁₋₄₀ (n=6-7 animais/grupo). As imagens foram obtidas com uma ampliação de 10 × (escala barra = 200 μm) ou 40 x (barra de escala = 50 μm; inserção). As células positivas são denotadas com setas. Número total de células positivas para BrdU presentes ao longo da ZSG de todo o GD hipocampal (B), bem como suas porções ventral (C) e dorsal (D). Os resultados estão representados como média + S.E.M. @@ p < 0,01 entre camundongos tratados com Aβ₁₋₄₀ e tratados com veículo (efeito principal significativo da administração de Aβ₁₋₄₀); \$ p < 0.05, \$\$ p < 0,01 em comparação com camundongos sedentários (efeito principal significativo do exercício físico); ** p < 0,01 em comparação com camundongos tratados com veículo; ## p < 0,01 em comparação com o grupo sedentário submetido a administração de Aβ₁₋₄₀ (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

1.5 DISCUSSÃO

A ocorrência de depressão em comorbidade com a DA está associada a maior frequência de sintomas motivacionais, incluindo fadiga, lentidão psicomotora e apatia, que são associados a redução da qualidade de vida desses pacientes (Teng *et al.*, 2008; Winter *et al.*, 2011; Galts *et al.*, 2019). No presente estudo, a administração de A β ₁₋₄₀ resultou no desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo (avaliado com o TNF) em camundongos. Além disso, a administração de A β ₁₋₄₀ também resultou em comportamento tipo-ansioso, como demonstrado pelos parâmetros avaliados no TCA (diminuição no tempo gasto no centro do aparato do campo aberto, aumento no número de episódios de autolimpeza e aumento no número de bolos fecais). É importante observar que esses déficits comportamentais foram acompanhados por níveis reduzidos de BDNF maduro e menor fosforilação de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) (indicativo de menor ativação) no hipocampo, bem como diminuição da proliferação celular e sobrevivência de células recém-geradas no nicho neurogênico do GD do hipocampo, incluindo porções ventrais e dorsais. Destaca-se que a maioria dos prejuízos comportamentais, neuroquímicos e estruturais induzidos por A β ₁₋₄₀ foi abolida em camundongos que praticaram 4 semanas de corrida em esteira (5 dias/semana/40 min/dia), estratégia terapêutica não invasiva e não-farmacológica, destacando os efeitos protetores do exercício físico neste modelo de DA que mimetiza as fases iniciais da doença em camundongos.

No presente estudo, um aumento significativo no tempo de imobilidade, bem como redução da latência para a imobilidade foram observados em camundongos submetidos ao TNF 10 dias após a administração de A β ₁₋₄₀, indicando que a exposição a A β ₁₋₄₀ resulta no desenvolvimento de comportamento do tipo-depressivo. A administração de A β ₁₋₄₀ e/ou exposição a 4 semanas de exercício físico em esteira não produziu efeitos significativos na atividade locomotora dos animais no TCA, indicando que as diferenças detectadas no TNF não foram o resultado de alterações simples na atividade locomotora geral. Esses resultados estão de acordo com achados anteriores que relataram nenhuma alteração na atividade locomotora em camundongos tratados com A β ₁₋₄₀ (Lanznaster *et al.*, 2016; Guerra De Souza *et al.*, 2018; Rosa *et al.*, 2018). Nós e outros grupos de pesquisa já demonstramos anteriormente que o protocolo de administração de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/sítio, i.c.v.) causa comportamento tipo-depressivo em camundongos, conforme avaliado pelo TSC (Dos Santos *et al.*, 2013; Ludka *et al.*, 2017; Rosa *et al.*, 2018) e o TNF (Guerra De Souza *et al.*, 2018). Corroborando com estes

achados e apoiando ainda mais a relação entre a exposição ao $A\beta_{1-40}$ e o desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo, demonstramos recentemente que o aumento no tempo de imobilidade no TSC induzido por $A\beta_{1-40}$ pode ser abolido pelo tratamento com o inibidor seletivo da recaptação da serotonina fluoxetina (um antidepressivo clássico) (Rosa *et al.*, 2018). Além disso, o mesmo protocolo de exposição ao $A\beta_{1-40}$ também mostrou ser sensível aos efeitos de vários compostos antidepressivos potenciais incluindo atorvastatina (Ludka *et al.*, 2017), neuropeptídeo Y (dos Santos *et al.*, 2013) e creatina (Rosa *et al.*, 2018). Juntos, esses achados sugerem que esse modelo de exposição ao $A\beta_{1-40}$ é útil para estudar os mecanismos subjacentes à comorbidade entre DA e depressão.

Além de ser um teste comumente utilizado para verificar possíveis efeitos estimulantes ou sedativos de drogas antidepressivas e estratégias antidepressivas não farmacológicas, o TCA é também uma ferramenta eficaz para o rastreamento de drogas ansiolíticas efetivas ou para a detecção de comportamentos tipo-ansioso (Prut e Belzung, 2003). Para este fim, o tempo gasto no centro do aparato, bem como o número de episódios de levantamento e de autolimpeza e o número de bolos fecais produzidos são medidas úteis para avaliar comportamento semelhante à ansiedade. Particularmente, o tempo gasto no centro do aparato pode fornecer uma indicação sobre se um dado tratamento ou intervenção resultou em comportamento tipo-ansioso ou ansiolítico. Quando o animal exibe um aumento do tempo gasto na periferia do campo aberto e uma redução no tempo gasto no centro, este perfil comportamental é interpretado como um comportamento ansioso e está relacionado com tigmotaxia (Hall, 1934). Por outro lado, a autolimpeza é considerada uma medida sensível do estresse e do comportamento relacionado à ansiedade (Kalueff *et al.*, 2016). Além disso, um aumento na defecação durante o TCA também é considerado um comportamento tipo-ansioso em roedores (Hall, 1934) e compostos ansiogênicos, como a cafeína e a N-metil-beta-carbolina-3-carboxamida (FG-7142), aumentam a defecação neste teste (Patki *et al.*, 2015). A interpretação dos episódios de levantamentos é mais complexa, com alguns estudos associando esse comportamento à ansiedade, enquanto outros sugeriram que esse comportamento está relacionado principalmente à atividade exploratória (Lever *et al.*, 2006).

No presente estudo, camundongos tratados com $A\beta_{1-40}$ apresentaram uma diminuição significativa no tempo gasto no centro do aparato no TCA, bem como um aumento no número de episódios de autolimpeza e no número de bolos fecais, parâmetros

que podem ser indicativos de comportamento tipo-ansioso. Por outro lado, os grupos submetidos ao exercício em esteira apresentaram um aumento do tempo de permanência no centro do TCA quando comparados aos camundongos sedentários, sugerindo que o exercício físico pode ter um efeito tipo ansiolítico. Além disso, este protocolo de 4 semanas de corrida em esteira foi eficaz em abolir o aumento na autolimpeza e defecação induzido por $A\beta_{1-40}$, reforçando que este protocolo de exercício físico pode proporcionar efeitos do tipo ansiolítico. Estes dados corroboram com a literatura, a qual relata que o exercício físico por 4 semanas foi capaz de prevenir o comportamento relacionado à ansiedade induzido pelo choque elétrico nas patas (Seo, 2018) ou pela privação do sono (Vollert *et al.*, 2011) em ratos.

Em contraste, no presente estudo, $A\beta_{1-40}$ e/ou corrida em esteira não alteram o número de episódios de levantamentos no TCA, um resultado que concorda com a ausência de efeito dessas intervenções na atividade locomotora geral. Assim, este achado concorda com a suposição de que o comportamento de levantamento pode ser interpretado como um tipo de atividade exploratória em roedores. De acordo, um estudo que comparou o comportamento relacionado à ansiedade em ratos classificados de acordo com a quantidade de levantamentos, não encontrou diferenças substanciais em relação às respostas emocionais entre animais que exibiram um alto número de respostas de levantamento comparados com animais que não exibiram esse perfil de resposta comportamental (Thiel *et al.*, 1999). Juntos, esses resultados sugerem que as respostas de levantamento podem não estar associadas ao comportamento relacionado à ansiedade.

É válido ressaltar que os sintomas depressivos podem preceder o diagnóstico clínico da DA ou ocorrer mais tardiamente, juntamente com o aparecimento dos déficits cognitivos (memória) (Chi *et al.*, 2014; Galts *et al.*, 2019). Em consonância com estas observações, no presente estudo, a administração de $A\beta_{1-40}$ não prejudicou o desempenho na tarefa de localização do objeto, um paradigma comportamental que tem sido usado para avaliar a memória dependente do hipocampo (Assini *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2012). Foi relatado em um estudo prévio que a ocorrência de comportamento tipo-depressivo precede a disfunção cognitiva na tarefa de localização do objeto em camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ na mesma dose usada no presente estudo (dos Santos *et al.*, 2013).

Neste estudo, também demonstramos que o protocolo de corrida em esteira por 4 semanas foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo em camundongos

submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$. Curiosamente, o exercício físico também foi eficaz na melhoria do desempenho cognitivo em camundongos tratados com veículo (não expostos ao $A\beta_{1-40}$), destacando ainda mais os efeitos benéficos do exercício físico no aumento do desempenho cognitivo. De forma similar ao nosso estudo, o exercício físico aeróbico em esteira foi capaz de prevenir a ocorrência de comportamento tipo- depressivo em outros modelos de depressão, incluindo exposição ao estresse crônico leve (Lee *et al.*, 2015) e bulbectomia olfatória (Shin *et al.*, 2017). No entanto, nesses estudos os animais realizaram exercício físico após a exposição ao estresse ou bulbectomia olfatória, enquanto em nosso estudo, camundongos realizaram a corrida em esteira antes da exposição ao $A\beta_{1-40}$, destacando o possível efeito profilático do exercício físico. Esta abordagem é particularmente relevante, considerando que as medidas preventivas representam um dos principais esforços no campo da neurologia (Hsu e Marshall, 2017).

Neurotrofinas como o BDNF têm sido implicadas nos mecanismos de ação de fármacos antidepressivos (Schmidt e Duman, 2007). Alterações nos níveis de BDNF têm sido implicadas na fisiopatologia tanto da depressão quanto da DA (Galts *et al.*, 2019), uma vez que os níveis cerebrais diminuídos dessa neurotrofina foram mostrados tanto na depressão (Sen *et al.*, 2008) como na DA (Platenik *et al.*, 2014). Além disso, tanto o exercício físico agudo quanto o crônico podem aumentar os níveis séricos de BDNF em humanos (Griffin *et al.*, 2011), um efeito que provavelmente está relacionado ao fato de que o exercício físico é efetivo no aumento do conteúdo de BDNF no músculo esquelético (Yu *et al.*, 2017). Além disso, o aumento nos níveis séricos de BDNF pode ser acompanhado por uma elevação nos níveis desta neurotrofina no cérebro. De fato, o BDNF periférico pode atravessar a barreira hematoencefálica através de um sistema de transporte de alta capacidade, saturável e unidirecional (Pan *et al.*, 1998). Recentemente, foi demonstrado que as contrações musculares podem induzir a expressão de BDNF no hipocampo (Maekawa *et al.*, 2018) e uma semana de corrida em esteira foi capaz de aumentar a expressão desse fator neurotrófico no hipocampo (particularmente no GD) e no córtex perirrinal (Griffin *et al.*, 2011).

No presente estudo, observamos uma redução significativa nos níveis de BDNF maduro no hipocampo de camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$. Vale ressaltar que este resultado está de acordo com estudos anteriores que mostram uma redução nos níveis dessa neurotrofina na sub-região hipocampal CA1 de ratos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ no hipocampo dorsal direito (Qiu *et al.*, 2006). Essa redução

nos níveis de BDNF pode estar subjacente, pelo menos em parte, ao desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo em camundongos expostos ao A β ₁₋₄₀. De fato, os níveis reduzidos de BDNF no hipocampo têm sido observados em vários modelos de depressão, sendo que este efeito pode ser revertido por agentes com potencial tipo-antidepressivo como creatina (Pazini et al., 2016) e o exercício físico em esteira por 4 semanas (Callaghan et al., 2017).

No presente estudo, a redução dos níveis de BDNF maduro induzida por A β ₁₋₄₀ no hipocampo foi abolida pelo exercício físico. Por outro lado, embora a exposição ao A β ₁₋₄₀ não tenha alterado os níveis séricos dessa neurotrofina, quatro semanas de corrida em esteira resultaram em um aumento nos níveis séricos da forma madura desse fator neurotrófico. Uma possibilidade para explicar o aumento de BDNF decorrente da prática de exercício físico seria a conversão de pró-BDNF para o BDNF maduro após o protocolo de corrida em esteira. Neste cenário, é importante notar que pró-BDNF e BDNF maduro têm efeitos opostos na sobrevivência neuronal e neurogênese hipocampal. O pró-BDNF está associado com apoptose enquanto o BDNF maduro está relacionado com neurogênese hipocampal (Chao, 2003; Chen et al., 2016). Curiosamente, o ambiente enriquecido aumentou a conversão do pró-BDNF em BDNF maduro no hipocampo de ratos (Cao et al., 2018). Além disso, um estudo recente mostrou que o exercício físico de resistência aumentou a proporção de BDNF/pró-BDNF no hipocampo de ratos, melhorando a neurogênese e abolindo o comportamento tipo-depressivo após acidente vascular cerebral (Luo et al., 2019).

Há evidências de que tanto na DA como na depressão ocorre uma disfunção na via de sinalização mediada por mTOR (Réus et al., 2015; Franco et al., 2017). A mTOR participa como uma proteína integradora de sinais ambientais e intrínsecos (por exemplo, fatores de crescimento, mitógenos, nutrientes, fontes energéticas e estresse) traduzindo estes estímulos em respostas celulares adequadas (Magnuson et al., 2012; Huang e Fingar, 2014). A mTOR constitui o núcleo catalítico de dois complexos de sinalização conhecidos, complexo mTORC1 e mTORC2. Fatores de crescimento, como o fator de crescimento de insulina 1 (IGF1) ou o fator de crescimento endotelial (EGF), ativam o mTORC1 através da PI3K-Akt ou da Ras-MAPK (ERK)- RSK, respectivamente. Após a ativação, a mTOR se autofosforila no resíduo Ser²⁴⁸¹. Após a ativação por mTORC1, a proteína ribossômica S6 cinase beta-1 (S6K1) fosforila mTOR no resíduo de Ser²⁴⁴⁸,

resultando em sua ativação por meio de uma retroalimentação positiva (Magnuson *et al.*, 2012; Huang e Fingar, 2014).

É digno de nota que um estudo *post mortem* mostrou um aumento na fosforilação (ou seja, ativação) de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) e seus alvos subsequentes S6/p-S6 e Raptor/p-Raptor no hipocampo de pacientes com DA em comparação aos controles. Além disso, esse aumento na fosforilação (ativação) de mTOR parece estar correlacionado com o declínio cognitivo e a gravidade da doença, sendo mais pronunciado no hipocampo de pacientes com DA avançada (Sun *et al.*, 2014). Ao contrário desses achados *post mortem*, no presente estudo, observamos uma redução significativa nos níveis de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) no hipocampo de animais tratados com A β ₁₋₄₀. Uma possível explicação para essa diferença entre os achados *post mortem* anteriores e os presentes resultados pode estar relacionada ao fato de que no presente estudo os níveis de fosforilação da mTOR foram avaliados apenas 10 dias após a administração de A β ₁₋₄₀, correspondendo a uma fase inicial da DA, antes do desenvolvimento de deficiências cognitivas (ou memória). Vale ressaltar que ocorreu uma ausência de efeito cognitivo na tarefa de localização do objeto nos animais submetidos à administração de A β ₁₋₄₀. Além disso, a diminuição da fosforilação da mTOR observada no presente estudo pode ser devido à redução da fosforilação da Akt. Esta proposição se baseia no fato que há relato de uma redução da fosforilação desta proteína no hipocampo de camundongos expostos à mesma dose de A β ₁₋₄₀ (Passos *et al.*, 2010). É válido ressaltar que uma redução semelhante na fosforilação da mTOR hipocampal também foi relatada em modelos animais de depressão, indicando que uma diminuição na ativação hipocampal da mTOR pode ser um mecanismo comum subjacente à ocorrência de comportamento tipo-depressivo. Por exemplo, roedores expostos ao estresse crônico imprevisível exibiram comportamento tipo-depressivo, acompanhado por uma redução nos níveis de fosforilação da mTOR no hipocampo (Zhong *et al.*, 2014). Além disso, a diminuição da fosforilação da mTOR também foi observada no hipocampo de camundongos submetidos à administração crônica de corticosterona, um modelo farmacológico de depressão (Pazini *et al.*, 2016). Portanto, a diminuição da fosforilação desta proteína em animais expostos ao A β ₁₋₄₀ pode estar, pelo menos em parte, relacionada ao comportamento tipo-depressivo exibido por estes animais.

Os efeitos do exercício físico na sinalização de mTOR no cérebro não estão totalmente elucidados. De fato, enquanto alguns estudos relataram aumento da ativação

da mTOR cerebral em roedores submetidos ao exercício físico, outros não relataram alterações nesta via de sinalização. Por exemplo, um estudo demonstrou que a corrida forçada em esteira (15 m/min, 30 min/dia, por 5 dias) aumentou os níveis de BDNF no hipocampo em camundongos, sendo este efeito associado à ativação do receptor TrkB e subsequente ativação da sinalização PI3K/Akt/mTORC1 (Fang *et al.*, 2013). Da mesma forma, 6 semanas de corrida voluntária ou forçada aumentaram a fosforilação da mTOR em várias regiões do cérebro, incluindo o hipocampo, a amígdala, o córtex pré-frontal e o estriado (Lloyd *et al.*, 2017). Por outro lado, em outro estudo, a corrida forçada em esteira só foi capaz de induzir um aumento transitório da expressão da mTOR no hipocampo de ratos. Esta maior expressão da mTOR foi detectada apenas 24 h após um dia de exercício físico em esteira, mas não estava mais presente quando os ratos foram submetidos a 2 semanas ou 8 semanas de corrida em esteira (Elfving *et al.*, 2013). Em outro estudo não foram observadas alterações na fosforilação da mTOR no hipocampo e no córtex cerebral de ratos submetidos a um protocolo de corrida em esteira (entre os dias pós-natal 21 e 60) (Victorino *et al.*, 2017). No presente estudo, embora o exercício físico por si só não tenha resultado em aumento da fosforilação/ativação da mTOR (como demonstrado pela comparação dos grupos exercitados sedentários e tratados com veículo), este protocolo de corrida em esteira foi capaz de prevenir a redução na fosforilação da mTOR hipocampal observada em camundongos sedentários submetidos à administração de A β ₁₋₄₀. Esses resultados são semelhantes aos relatados anteriormente em ratos submetidos ao estresse de imobilização, um protocolo que reduziu a fosforilação da mTOR hipocampal em animais de controle (sedentários), mas não naqueles que foram submetidos a um protocolo de corrida em esteira (Fang *et al.*, 2013). Esses resultados sugerem que a corrida em esteira pode potencializar a ativação da mTOR, particularmente em condições associadas à diminuição de sua fosforilação.

A ZSG do GD hipocampal é um dos poucos nichos neurogênicos no encéfalo de mamíferos adultos (Toda *et al.*, 2019). A neurogênese do hipocampo adulto engloba a geração de novas células granulares funcionais provenientes de células-tronco neurais adultas localizadas na ZSG através da amplificação de células progenitoras intermediárias e neuroblastos (ou seja, neurônios imaturos), bem como a integração desses neurônios recém-gerados em células neurais em circuitos existentes (Kempermann *et al.*, 2004; Lie *et al.*, 2004). O processo neurogênico é regulado e influenciado por múltiplos fatores ambientais e intrínsecos da célula. Diversos estudos sugerem que déficits na neurogênese

hipocampal podem ser responsáveis, pelo menos em parte, por algumas das alterações na função hipocampal observadas tanto na DA quanto na depressão (Toda *et al.*, 2019). De fato, um dano na proliferação de células do hipocampo foi previamente relatado em ratos submetidos à administração de A β ₁₋₄₀ por 10 semanas (Kimura *et al.*, 2009). Concordando com essas evidências, no presente estudo, a administração de A β ₁₋₄₀ diminuiu a proliferação celular e a sobrevivência de células recém-geradas no GD do hipocampo. Por outro lado, esses déficits na plasticidade estrutural do hipocampo induzidos por A β ₁₋₄₀ foram prevenidos pelo protocolo de exercício físico em esteira por 4 semanas, destacando o efeito protetor da corrida moderada na modulação dessas duas fases críticas do processo neurogênico. O período de 4 semanas corresponde ao tempo necessário para que as células recém geradas amadureçam completamente e, portanto, constitui o tempo ideal para avaliar a sobrevivência de células recém-geradas no hipocampo. Vários estudos sobre os efeitos do exercício físico na neurogênese do hipocampo em adultos utilizaram protocolos de exercício físico com duração semelhante ao usado no presente estudo (Ma *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Sung, 2015; Luo *et al.*, 2019).

Também mostramos que a redução na proliferação e sobrevivência celular induzido por A β ₁₋₄₀ ocorreu tanto na porção ventral e dorsal do GD hipocampal. É importante ressaltar que enquanto o hipocampo dorsal se comunica com regiões cerebrais associadas à cognição, estando envolvido principalmente nos processos de aprendizagem e memória, o hipocampo ventral tem conexões com regiões cerebrais envolvidas na regulação emocional e no comportamento afetivo, sendo portanto, principalmente envolvido na mediação da resposta ao estresse, bem como emoção e afeto (Fanselow e Dong, 2010). Desta forma, a ausência de diferenças na proliferação celular e na sobrevivência de células recém-geradas entre as porções dorsal e ventral do GD do hipocampo em camundongos submetidos à administração de A β ₁₋₄₀ sugere que esse peptídeo provoca um amplo comprometimento nesses estágios de neurogênese, ao longo de todo o eixo dorso-ventral do hipocampo. Esse achado não foi relatado anteriormente na literatura. Além disso, enquanto a redução na proliferação e sobrevivência celular observada no GD dorsal pode estar associada aos déficits cognitivos associados à exposição A β ₁₋₄₀, a diminuição na proliferação e sobrevivência celular que foi observada no GD ventral provavelmente contribui para o comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de A β ₁₋₄₀. De forma semelhante, foi relatado que 3 dias de privação de sono, um protocolo que causa déficits cognitivos e resposta anormal ao estresse,

causou redução da proliferação celular tanto no aspecto dorsal quanto ventral da ZSG do hipocampo de rato, avaliada por imuno-histoquímica para a proteína Ki-67 do ciclo celular (Murata *et al.*, 2018). Por outro lado, uma diminuição na proliferação celular foi especificamente observada na porção ventral do GD do hipocampo em um modelo de depressão induzido pela administração crônica de corticosterona em camundongos (Pazini *et al.*, 2017).

No presente estudo, o exercício físico *per se* foi efetivo no aumento de proliferação e a sobrevivência de células recém-geradas tanto do GD dorsal e ventral, um resultado que pode estar relacionado ao fato de que este protocolo de exercício físico foi capaz de melhorar o desempenho cognitivo, bem como provocar um efeito tipo-antidepressivo em camundongos tratados com veículo. Esses achados estão de acordo com estudos prévios que mostram o potente efeito pró-neurogênico do protocolo de corrida em esteira por 4 semanas em roedores (Kim *et al.*, 2014; Sung, 2015; Kim *et al.*, 2017). Além disso, nossos resultados também sugerem que este protocolo de corrida em esteira pode ser uma estratégia não invasiva para prevenir o comprometimento do processo neurogênico observado após a administração de A β ₁₋₄₀. De acordo com estes resultados, um estudo anterior usando o modelo de camundongo transgênico da DA (3xTg) demonstrou que o protocolo de corrida em roda voluntária durante 11 semanas foi eficaz no aumento da neurogênese do hipocampo adulto, mas sem prevenir as alterações neuropatológicas características desta doença. É importante destacar que a fluoxetina não foi capaz de promover a neurogênese hipocampal adulta neste modelo transgênico de DA, ao contrário do exercício físico em roda de corrida voluntária, destacando ainda mais o potente efeito pró-neurogênico do exercício físico (Marlatt *et al.*, 2013). Da mesma forma, camundongos transgênicos para DA (TgCRND8) submetidos ao protocolo de roda de corrida voluntária por 2 meses não apresentaram declínio no número de células positivas para BrdU no GD hipocampal (Maliszewska-Cyna *et al.*, 2016). Considerando estas descobertas, é razoável especular que a manutenção da neurogênese no hipocampo de animais adultos por meio da prática de exercício físico pode promover plasticidade estrutural e funcional na DA. Estudos futuros são necessários para melhor caracterizar o modelo induzido por A β ₁₋₄₀ e determinar se as mudanças comportamentais, neuroquímicas e estruturais relatadas aqui progredem com a exposição a longo prazo a esse peptídeo. Ainda é importante investigar futuramente se a prática de exercício físico

também é capaz de prevenir déficits associados a estágios posteriores de progressão da DA.

I.6 CONCLUSÃO

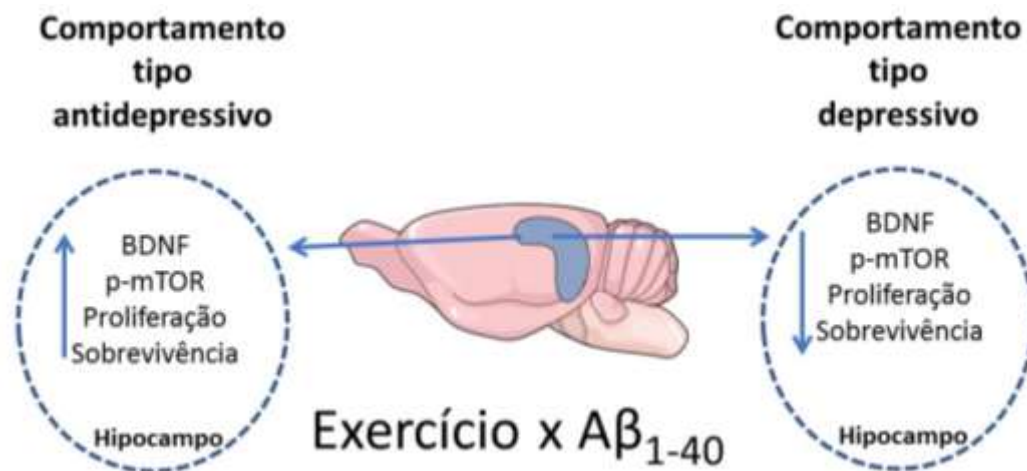
Os resultados do presente estudo sumarizados na **Tabela 1** e ilustrados na **Figura 18** corroboram com achados prévios mostrando que a administração *in vivo* do A β ₁₋₄₀ em camundongos constitui um modelo experimental útil para estudar o comportamento tipo-depressivo e as alterações neuroquímicas e estruturais associadas ao hipocampo. O comportamento tipo-depressivo induzido por A β ₁₋₄₀ foi paralelamente acompanhado pela redução nos níveis de BDNF maduro e fosforilação de mTOR (Ser²⁴⁴⁸) no hipocampo, alterações relacionadas com prejuízo na sobrevivência celular nesta estrutura. Além disso, a administração de A β ₁₋₄₀ reduziu a proliferação celular e a sobrevivência de células recém-geradas em todo o GD do hipocampo, incluindo suas porções ventral e dorsal. É importante ressaltar que um protocolo moderado de corrida em esteira por 4 semanas foi eficaz em prevenir esses déficits, principalmente no GD ventral, indicando que a prática de exercício físico pode ser uma estratégia de estilo de vida eficaz para prevenir DA e/ou retardar sua progressão.

Tabela 1- Resumo dos resultados obtidos no Capítulo I

Parâmetros	Grupos		
	Exercitado	A β Sedentário	A β + Exercício
Imobilidade	↓	↑	≠
Latência imobilidade	=	↓	≠
cruzamentos	=	=	=
Tempo no centro	↑	=	↑
N° de autolimpeza	=	↑	≠
Bolos fecais	=	↑	≠
N° de levantamentos	=	=	=
Realocação de objeto Treino	=	=	=
Realocação de objeto Teste	↑	↑	↑
BDNF sérico	↑	=	↑
BDNF hipocampal	=	↓	≠
p-mTOR (Ser ²⁴⁴⁸)	=	↓	≠
mTOR total	=	=	=
Proliferação total	↑	↓	≠
Proliferação no GD ventral	↑	↓	≠
Proliferação no GD dorsal	↑	=	↑
Sobrevivência total	↑	=	↑
Sobrevivência GD ventral	↑	↓	≠
Sobrevivência GD dorsal	↑	=	↑

Legenda: ↑ aumento em relação ao grupo controle; ↓ redução em relação ao grupo controle; = sem diferença significativa em relação ao grupo controle; ≠ prevenção do efeito em relação ao grupo sedentário A β .

Figura 18- Representação esquemática dos resultados comportamentais e morfológicos obtidos no Capítulo I



Legenda: Resumo dos resultados obtidos no Capítulo I, animais submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ apresentaram comportamento tipo-depressivo e ansioso, diminuição de BDNF e fosforilação de mTOR no hipocampo, como também a diminuição da proliferação e sobrevivência celular no GD do hipocampo. A prática de exercício físico foi capaz de prevenir esses parâmetros. Fonte: do Autor.

CAPÍTULO II: EFEITO PROFILÁTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO NO COMPORTAMENTO TIPO-DEPRESSIVO E DISFUNÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL INDUZIDO POR A β ₁₋₄₀

II.1 INTRODUÇÃO

A DA é reconhecida pela OMS como uma prioridade global de saúde pública, pois é a forma mais comum de demência em idosos e é a principal causa de incapacidade no final da vida (Lane *et al.*, 2018). Além disso, os pacientes com DA podem apresentar sintomas psiquiátricos, e o distúrbio psiquiátrico mais comum presente nesses indivíduos é a depressão (Galts *et al.*, 2019). Um estudo de meta-análise relatou que a depressão está presente em aproximadamente 40%-50% dos casos de DA, resultando em maior institucionalização e mortalidade desses indivíduos (Chi *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2016).

A disfunção no eixo microbiota-intestino-cérebro pode estar subjacente tanto à patogênese da DA como da depressão (Cenit *et al.*, 2017; Kobayashi *et al.*, 2017; Quigley, 2017). Portanto, a regulação do microbioma comensal do intestino que desempenha um papel essencial na proteção contra infecções, modelando e regulando as respostas imunes, mantendo a homeostase do hospedeiro (Zhang *et al.*, 2015), poderia ser uma terapia promissora tanto para a DA (Bonfili *et al.*, 2017) como para a depressão (Cheung *et al.*, 2019).

As células caliciformes do epitélio intestinal são importantes reguladoras da homeostase intestinal, pois secretam mucinas e outros produtos essenciais para a defesa intestinal (Allaire *et al.*, 2018). Tem sido indicado que as células de Paneth (células especializadas no epitélio do intestino delgado) também desempenham um papel importante na imunidade inata através da sua capacidade de secretar peptídeos e proteínas antimicrobianas (Elphick e Mahida, 2005). A imunidade inata fornece a primeira linha de defesa contra microorganismos invasores e confere proteção ao desencadear respostas inflamatórias e antimicrobianas. Os déficits das células de Paneth induzem a disbiose da microbiota em camundongos (Riba *et al.*, 2017), que pode ser um fator de risco para depressão (Liang *et al.*, 2018). Portanto, estratégias terapêuticas que poderiam melhorar a resposta de células de Paneth poderiam ser um novo alvo para o manejo de sintomas depressivos associados a alterações neurodegenerativas.

Os principais desafios atuais na depressão associados à DA incluem a falta de tratamentos eficazes e poucas estratégias preventivas bem estabelecidas. O exercício

físico tem sido proposto como estratégia não farmacológica tanto para DA (Paillard *et al.*, 2015; Cass, 2017) como para depressão (Stanton e Reaburn, 2014). Recentemente, relatamos o efeito profilático do exercício físico em esteira no comportamento tipo-depressivo induzido por A β ₁₋₄₀ em camundongos (Rosa *et al.*, 2019), um efeito associado à modulação do BDNF hipocampal, sinalização mTOR e promoção da proliferação celular, sobrevivência de células recém-geradas no GD hipocampal. Vale ressaltar que evidências sugerem que a neurogênese do hipocampo adulto pode ser influenciada pelo microbioma (Ogbonnaya *et al.*, 2015). Além disso, foi relatado que o exercício físico pode modificar a composição da microbiota intestinal em humanos e roedores (Allen *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Monda *et al.*, 2017; Dalton *et al.*, 2019).

Diante deste cenário, o presente estudo avaliou os possíveis efeitos profiláticos do exercício físico sobre alterações comportamentais e relacionadas ao eixo intestino-microbiota-cérebro em camundongos: a) comportamento tipo-depressivo avaliado no TSC e no FUST; b) parâmetros morfológicos no duodeno avaliados pela coloração de hematoxilina e eosina e microscopia eletrônica de transmissão; c) abundância de bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes no conteúdo fecal.

II.2 MATERIAIS E MÉTODOS

II.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (30-40 g, 45-55 dias de idade) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brasil). Os camundongos foram alojados em grupos de 10 animais por gaiola de plástico sob condições controladas de luz (luzes acesas no período de 7:00 às 19:00 horas) e temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$). Os camundongos tiveram acesso livre à ração padrão de laboratório e à água da torneira filtrada e se adaptaram ao laboratório por pelo menos 1 semana antes do início do protocolo experimental. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais específicos. Todas as manipulações foram realizadas entre 13:00 e 17:00 horas. Todos os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Instituição (CEUA N° 5142180518). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais usados nesses experimentos.

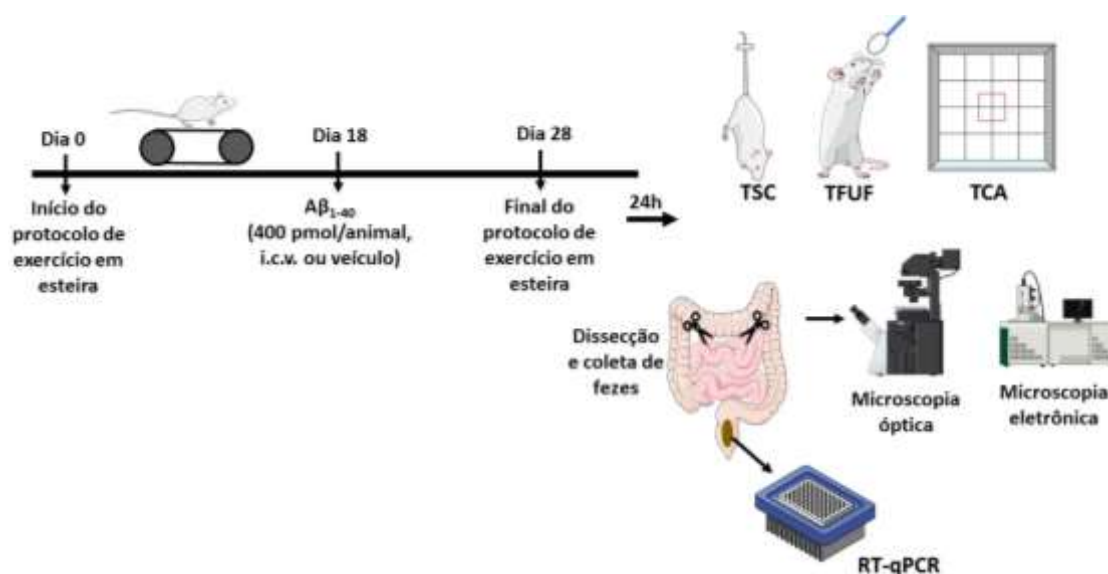
II.2.2 Tratamentos

Foi utilizado $A\beta_{1-40}$ (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) dissolvido em solução tampão salina fosfato (PBS; pH 7,4; 1 mg/mL) e incubada a 37°C durante quatro dias para induzir a agregação. $A\beta_{1-40}$ (3 μ l; 400 pmol/camundongo) foi administrado por via i.c.v. Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano (2,5%; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) antes das injeções i.c.v., as quais foram realizadas usando um método à mão livre. Resumidamente, uma agulha hipodérmica de 0,4 mm de diâmetro externo presa a uma cânula ligada a uma seringa Hamilton de 25 μ l foi inserida perpendicularmente através do crânio (não mais do que 2 mm no cérebro) de cada camundongo. $A\beta_{1-40}$ ou veículo (PBS) foi injetado diretamente no ventrículo lateral esquerdo, nas seguintes coordenadas de bregma: ântero-posterior (AP) 0,1 mm; mediolateral (ML) 1 mm; e dorsoventral (DV) 3 mm. Todos os camundongos exibiram um comportamento normal dentro de 1 min após a injeção. A injeção foi administrada por 30 segundos e a agulha permaneceu por mais 15 segundos para evitar o refluxo das substâncias injetadas. O local da injeção foi de 1 mm à esquerda do ponto médio em uma linha traçada através da base anterior das orelhas. Após a dissecação de cada encéfalo, o local da injeção foi examinado macroscopicamente, sendo que em casos de posicionamento errado da injeção ou qualquer sinal de hemorragia cerebral foram excluídos das análises restantes (<5%) (Rosa *et al.*, 2018; Prediger *et al.*, 2007). $A\beta_{1-40}$ ou veículo foram administrados dez dias antes dos testes comportamentais (Rosa *et al.*, 2018; Ludka *et al.*, 2017).

II.2.3 Protocolo de Exercício físico

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: 1-sedentários; 2-exercício em esteira; 3-sedentários/ $A\beta_{1-40}$; 4- exercício em esteira/ $A\beta_{1-40}$. Os animais dos grupos exercitados foram submetidos a um período de 4 semanas de exercício físico composto por 5 sessões de corrida por semana (segunda a sexta-feira) em aparelho de esteira (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Cada sessão de corrida durou 40 min/dia. A velocidade da esteira foi progressivamente aumentada (em incrementos de 2 m/min por semana) durante o período de 4 semanas, iniciando em 6 m/min no início do protocolo e concluindo com 12 m/min ao final do protocolo. O protocolo de corrida foi realizado entre às 13:00 e às 15:00 horas. Os camundongos do grupo controle (sedentários) foram colocados em uma esteira travada pelo mesmo período de tempo. Os animais dos grupos de corrida foram monitorados de perto para garantir sua segurança e treinamento (Rosa *et al.*, 2019) (**Figura 19**).

Figura 19- Linha do tempo experimental.

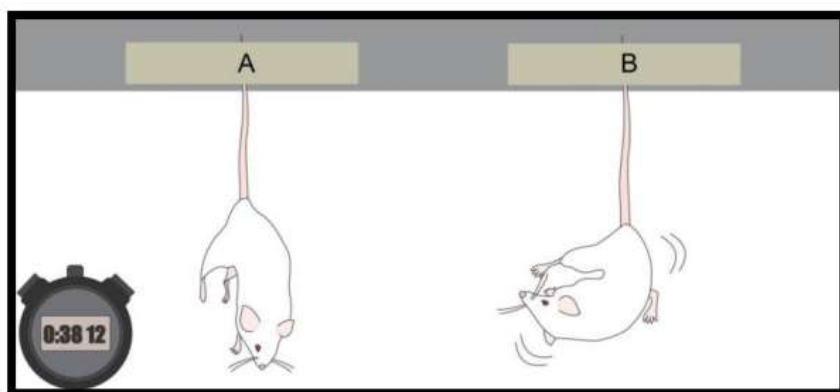


Legenda: Os camundongos dos grupos exercitados foram submetidos a 4 semanas de corrida em esteira (5 dias/semana, 40 min/dia). Dezoito dias após o início do protocolo de exercício físico os camundongos receberam administração de A β ₁₋₄₀ (400 pmol/ animal/ i.c.v.) ou veículo pela via i.c.v. Vinte e quatro horas após o último dia de exercício físico os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais (teste de suspensão pela cauda- TSC, teste do farejamento da urina de fêmea -TFUF e teste do campo aberto - TCA). Subsequentemente, os camundongos foram transcardialmente perfundidos, o duodeno e as fezes foram coletados, as secções do duodeno foram processadas para análise histológica do duodeno por coloração com H&E e para análise em microscopia eletrônica de transmissão das células de Paneth e microvilosidades. As fezes foram coletadas para análise de filamentos de bactérias por RT- qPCR. (Fonte: do Autor, com algumas imagens obtidas do *Mind the Graph*).

II.2.4 Teste de suspensão pela cauda (TSC)

Os camundongos foram suspensos pela cauda com fita adesiva a 50 cm do chão e o tempo de imobilidade (em segundos) foi registado numa sessão de 6 min (Steru *et al.*, 1985). Os camundongos foram considerados imóveis apenas quando suspensos passivamente e completamente imóveis. Este teste tem validade preditiva, uma vez que os antidepressivos convencionais diminuem o tempo de imobilidade neste teste (**Figura 20**).

Figura 20 - Teste de suspensão pela cauda

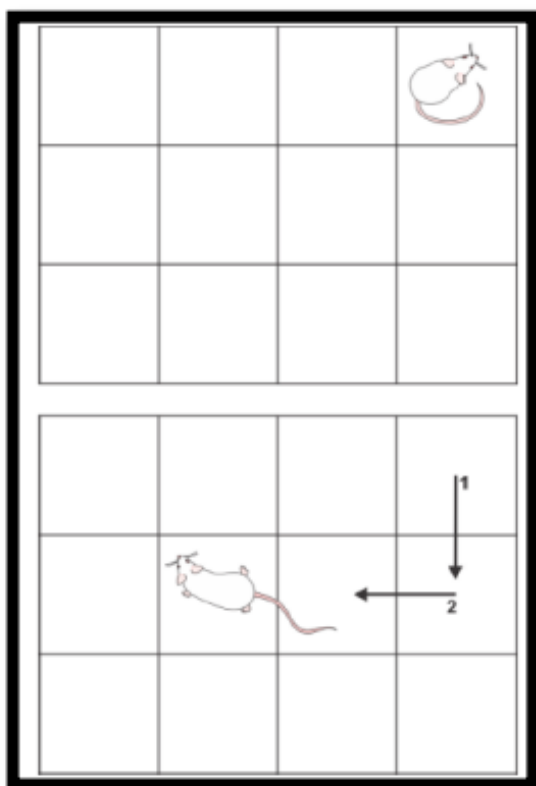


Legenda: A) Representa o animal imóvel e B) representa o animal em movimento. Fonte: imagem cedida por Ágatha Oliveira.

II.2.5 Teste de campo aberto (TCA)

Para avaliar os efeitos do tratamento farmacológico sobre a atividade locomotora, os camundongos foram avaliados no teste do campo aberto, como descrito anteriormente (Rodrigues *et al.*, 2002). Os camundongos foram colocados individualmente em uma caixa de madeira ($40 \times 60 \times 50$ cm) com o piso dividido em 12 quadrantes iguais. O número de quadrantes cruzados pelo animal com suas quatro patas (cruzamentos) foi registrado durante um período de 6 min (**Figura 21**).

Figura 21- Teste do campo aberto

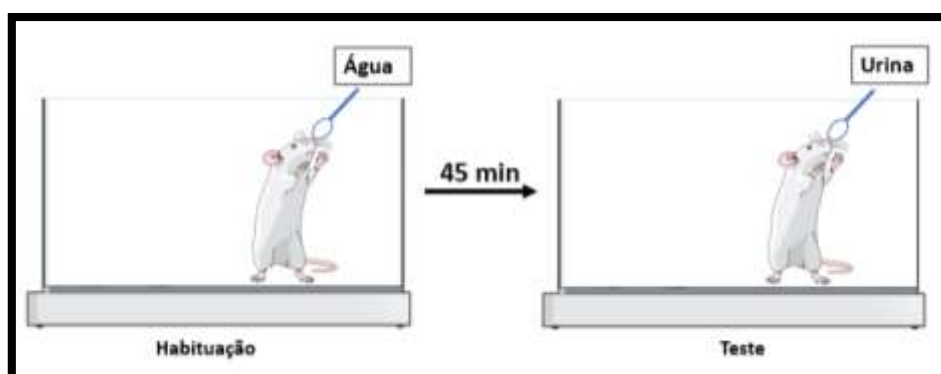


Legenda: Os animais são colocados dentro de uma arena quadriculada e o número de cruzamentos com as 4 patas é registrado. Fonte: imagem cedida por Ágatha Oliveira.

II.2.5 O teste de farejamento da urina da fêmea (TFUF)

Neste teste, o comportamento de busca de recompensa foi avaliado. Uma hora antes do teste, os camundongos foram habituados a uma haste flexível com ponta de algodão inserido na sua gaiola. O teste teve três fases: 1) uma exposição (3 min) a esta haste embebida em água deionizada; 2) um intervalo de 45 min durante o qual o animal não foi exposto ao procedimento; e 3) uma exposição (3 min) a uma haste flexível embebida em urina fresca coletada de fêmeas na fase estro do ciclo estral. Durante a fase 3, a duração do farejamento foi registrada (Malkesman *et al.*, 2010) (**Figura 22**).

Figura 22 - Teste de farejamento da urina da fêmea



Legenda: Na fase de habituação o animal é exposto a uma haste flexível com água por 3 min. Após 45 minutos, o animal é exposto a uma haste flexível embebida em urina de fêmea na fase estro do ciclo estral, por 3 min, sendo o tempo de farejamento registrado. (Fonte: do Autor, com algumas imagens obtidas do *Mind the Graph*).

II.2.6 Coloração com hematoxilina e eosina (H&E)

Os camundongos foram anestesiados com pentobarbital (50 mg / kg, i.p.) e transcardialmente perfundidos com cloreto de sódio a 0,9% (NaCl) seguido por paraformaldeído a 4% (PFA). O duodeno foi dissecado e um segmento de aproximadamente 5 cm foi coletado, fixado em PFA a 4% e embebido em parafina. Secções (5 µm) foram cortadas dos blocos em parafina utilizando um micrótomo rotativo Leica RM2255 (Leica Biosystems Nussloch, Heidelberger Straße, Alemanha). As secções foram então coradas com hematoxilina e eosina (H&E) utilizando o sistema de transferência Leica ST5010 Autostainer XL (Leica Biosystems Nussloch, Heidelberger Straße, Alemanha) com protocolos padrão. As lâminas foram montadas usando uma resina sintética (Entellan; Merck, Alemanha). As análises foram realizadas em imagens do scanner de slides Axion Scan (ZEISS International, Oberkochen, Alemanha). A altura e a largura de 5 vilosidades foram medidas por cada segmento para determinar a altura das vilosidades. Células caliciformes foram contadas em 5 vilosidades e as células de Paneth foram contadas em 5 criptas. A profundidade da cripta foi medida a partir da junção cripta-vilosidade até a base em 5 amostras.

II.2.7 Microscopia eletrônica de transmissão de células de Paneth e microvilosidades

Após a perfusão transcardíaca, um segmento duodenal (2 cm) foi retirado de dois camundongos por grupo. Os segmentos duodenais foram fixados por 24 h em glutaraldeído a 2,5% em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS) pH 7,4, e pós-fixados por 1 h em solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato pH 7,4 (1:1). As amostras foram lavadas com PBS seguido de água (10 min cada lavagem). Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série utilizando acetona em diversas concentrações e, em seguida, incorporadas na resina de Spurr (EMS, Hatfield, PA, EUA). Secções ultrafinas (70 nm) foram feitas utilizando um ultramicrotomo (Leica, Reichert Ultracut S, Viena, Austria) e contrastadas utilizando acetato de uranilo e citrato de chumbo. As fotomicrografias foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011 (JEOL, Tóquio, Japão) a 80 kV.

II.2.8 Coleta de Amostras Fecais, Extração de DNA e PCR quantitativo em tempo real

Amostras fecais foram coletadas imediatamente após os testes comportamentais, diretamente a partir do cólon em frascos estéreis e foram imediatamente congeladas a -80°C antes da extração do DNA. O DNA genômico microbiano foi extraído de cada amostra fecal usando um kit FastDNA™ Spin (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, EUA) de acordo com a recomendação do fabricante. As condições de amplificação foram 50°C durante 2 min, 95 ° C durante 10 min seguido por 40 ciclos de 95°C durante 30 s e 60°C durante 90 s. Os iniciadores utilizados foram desenhados com o software Primer Express versão 3.0 (Applied Biosystems, EUA) e as sequências são descritas subsequentemente: bactérias totais (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG) e reversas (ATTACCGCGGCTCTGG); Firmicutes *forward* (GCAGTAGGGAATCTTCCG) e reverso (ATTACCGCGGCTGCTGG), Bacteroidetes *forward* (GTACTGAGACACGGACCA) e reverso (ATTACCGCGGCTCTGG) (Invitrogen, EUA). Os ensaios quantitativos de PCR em tempo real do gene do RNA ribossômico 16S (rRNA) foram realizados utilizando o protocolo descrito por Fierer et al. (2005). Os resultados foram analisados pelo programa software Sequence Detection Systems (SDS) versão 2.4 (Applied Biosystems, CA, EUA).

II. 3 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (S.E.M.). As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas por análise de variância de duas vias (ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Duncan, quando apropriado. A análise de correlação de Pearson foi realizada para investigar qualquer possível relação entre comportamento, parâmetros morfológicos do duodeno e microbiota. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

II.4 RESULTADOS

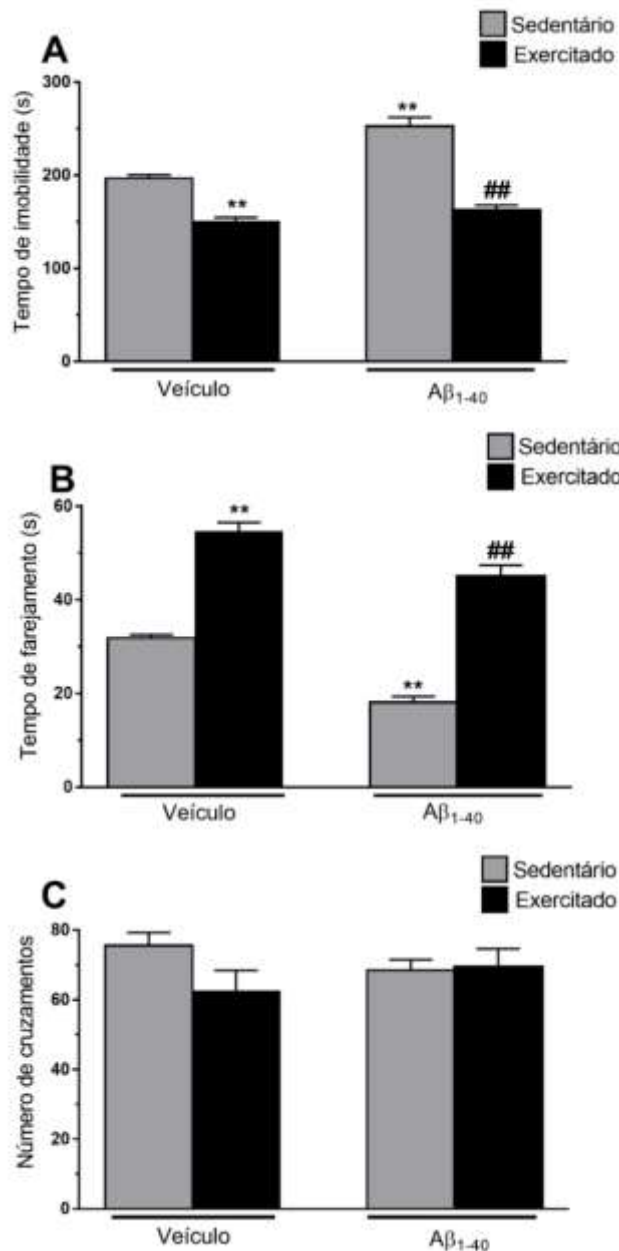
II.4.1 Efeito do exercício físico em esteira no TSC e no TFUF

Os resultados apresentados na **Figura 23A** mostram os efeitos do protocolo de exercício físico em esteira rolante (4 semanas, 40 min/dia) e/ou da administração $A\beta_{1-40}$ no TSC. A ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo do tratamento $A\beta_{1-40}$ [$F(1,24) = 30,55, p < 0,01$]; corrida em esteira [$F(1,24) = 122,97, p < 0,01$]; e a interação da administração de $A\beta_{1-40}$ x corrida em esteira [$F(1,24) = 12,82, p < 0,01$] em relação ao tempo de imobilidade no TSC. A análise *post hoc* indicou que a exposição a $A\beta_{1-40}$ aumentou significativamente o tempo de imobilidade no teste, em comparação com a administração do veículo ($p < 0,01$). Além disso, o protocolo de exercício físico reduziu o tempo de imobilidade no TSC tanto em camundongos tratados com veículo ($p < 0,01$) quanto com $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,01$), indicando que este protocolo de exercício físico teve um efeito tipo-antidepressivo em camundongos sedentários e evitou a ocorrência de comportamento tipo-depressivo em camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$.

Os resultados apresentados na **Figura 23B** mostram os efeitos da corrida em esteira e/ou da administração do $A\beta_{1-40}$ no comportamento motivacional em camundongos submetidos ao TFUF. Em relação ao tempo gasto com farejamento, a ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo da corrida em esteira ([$F(1,24) = 210,87, p < 0,01$]) e a administração do $A\beta_{1-40}$ ([$F(1,24) = 46,53, p < 0,01$]), mas não foi observada uma interação significativa da interação $A\beta_{1-40}$ x corrida em esteira ([$F(1,24) = 1,47, p = 0,23$].) A análise *post hoc* mostrou uma diminuição do tempo gasto no farejamento da urina da fêmea na fase estro do ciclo estral em camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,01$), um efeito prevenido pelo exercício físico. Além disso, os camundongos submetidos a exercício físico dispenderam mais tempo cheirando a urina da fêmea, em comparação com camundongos sedentários ($p < 0,01$). A **Figura 23C** mostrou que a administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou corrida em esteira não teve efeito significativo sobre a atividade locomotora global, avaliada com o TCA (tratamento com

$A\beta_{1-40}$ [F (1,24) = 0,01, p = 0,97]; esteira em esteira [F (1,24) = 1,71, p = 0,20]; administração de $A\beta_{1-40}$ x corrida em esteira [F (1,24) = 2.33, p = 0.14]).

Figura 23 - Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico em esteira no TSC e no TFUF



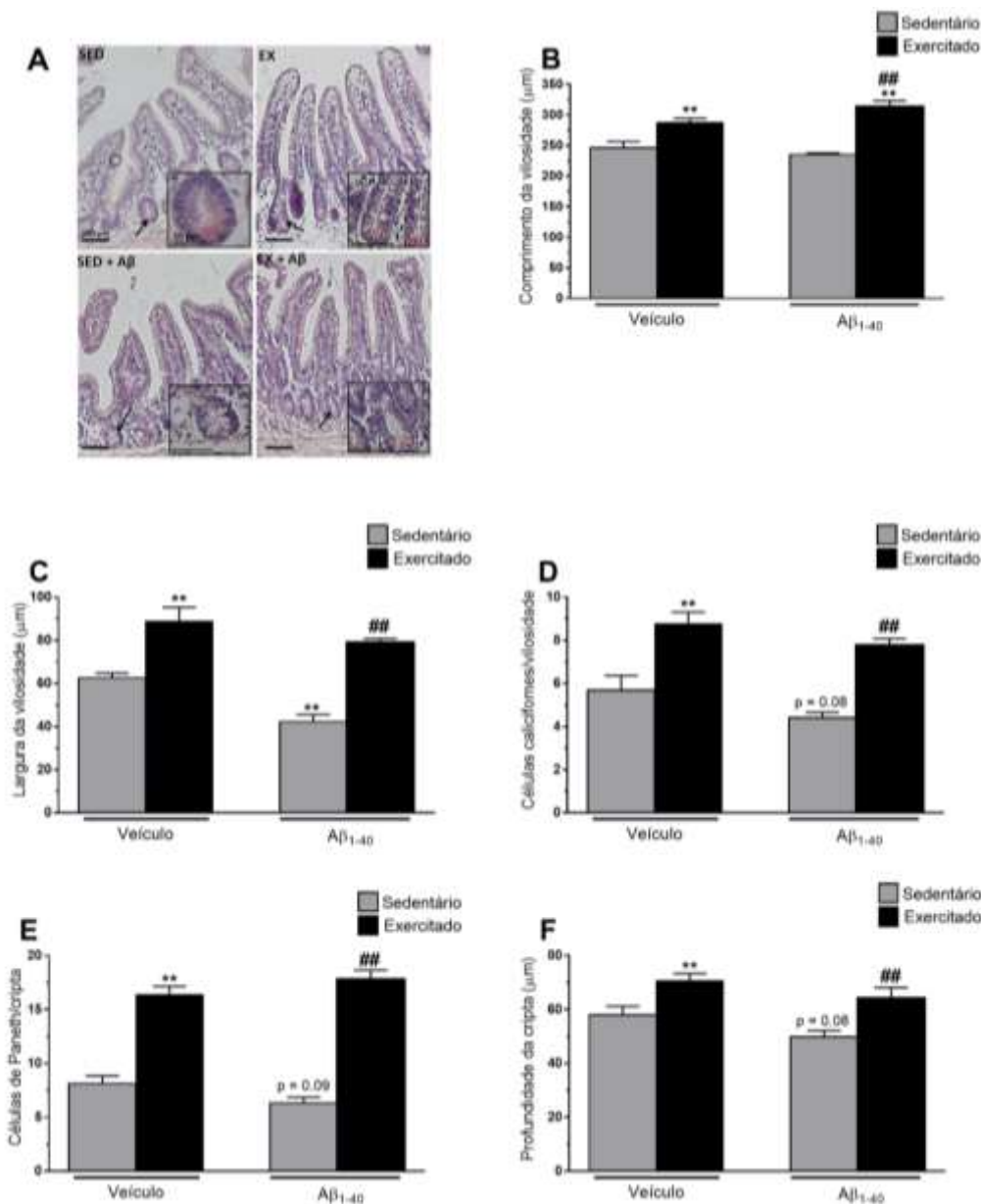
Legenda: Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e / ou exercício físico no tempo de imobilidade (A) no TSC, no tempo de farejamento no TFUF (B) e no número de cruzamentos no TCA (C) (n = 8 animais / grupo). Barras representam médias + S.E.M. ** p < 0,01 quando comparado com o grupo tratado com veículo; ## p < 0,01 em comparação com o grupo sedentário submetidos a administração de $A\beta_{1-40}$ (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

II.4.2 Efeito do exercício físico em esteira e/ou da administração de $A\beta_{1-40}$ em parâmetros morfológicos do duodeno avaliados por coloração de H&E

A **Fig. 24** descreve os efeitos da corrida em esteira e da administração de $A\beta_{1-40}$ em parâmetros morfológicos do duodeno avaliados por coloração com H&E. A **Fig. 24B** ilustra a comprimento das vilosidades de camundongos sedentários e exercitados submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$. A ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo da corrida em esteira [$F(1,16) = 56,68, p < 0,01$] e efeito significativo da administração de $A\beta_{1-40}$ x interação corrida em esteira [$F(1,16) = 5,43, p = 0,05$], mas sem efeito principal significativo da administração de $A\beta_{1-40}$ [$F(1,16) = 0,78, p = 0,36$] em relação à altura das vilosidades. A análise *post hoc* revelou que a altura das vilosidades é maior nos camundongos exercitados em comparação com camundongos sedentários, independentemente da administração de $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,01$). Além disso, as vilosidades possuem maior comprimento no grupo submetido à administração de $A\beta_{1-40}$ que previamente foi submetido ao protocolo de exercício em esteira em comparação com o grupo sedentário submetido à administração de $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,01$). A **Fig. 24C** mostra a influência da administração de $A\beta_{1-40}$ e exercício físico em esteira na largura das vilosidades do duodeno. A ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo da corrida em esteira ([$F(1,16) = 66,04, p < 0,01$]), um efeito principal significativo da administração do $A\beta_{1-40}$ ([$F(1,16) = 15,10, p < 0,01$]), mas nenhum efeito significativo da interação entre a administração $A\beta_{1-40}$ x interação corrida em esteira ([$F(1,16) = 1,81, p = 0,19$]). A análise *post hoc* revelou que a largura das vilosidades foi maior nos camundongos exercitados em comparação com os camundongos sedentários. Além disso, a administração de $A\beta_{1-40}$ causou uma redução neste parâmetro morfológico, um efeito que foi prevenido pelo exercício físico em esteira. A **Fig. 24D** ilustra o número de células caliciformes/vilosidade em camundongos exercitados e sedentários submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$. A ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo da corrida em esteira ([$F(1,16) = 43,85, p < 0,01$]) e um efeito principal significativo da administração de $A\beta_{1-40}$ ([$F(1,16) = 5,49, p < 0,05$]), mas nenhum efeito significativo da interação administração de $A\beta_{1-40}$ x corrida em esteira ([$F(1,16) = 0,08, p = 0,77$]). Análise *post hoc* indicou que camundongos submetidos ao exercício físico apresentaram maior número de células caliciformes em comparação ao grupo controle ($p < 0,01$). A administração de $A\beta_{1-40}$ mostrou uma tendência ($p = 0,08$) para diminuir o número destas

células em comparação com o grupo controle. Além disso, os camundongos exercitados submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ apresentaram maior número de células caliciformes em comparação com grupo sedentário submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,01$). A **Fig 24E** descreve os efeitos da corrida em esteira e da administração de $A\beta_{1-40}$ em relação a quantidade de células Paneth/cripta. Em relação a este parâmetro, a ANOVA duas vias revelou um efeito principal significativo da corrida em esteira [$F(1,16) = 191,86$, $p < 0,01$] e um efeito significativo da interação da administração de $A\beta_{1-40}$ x corrida em esteira [$F(1,16) = 5,10$, $p < 0,05$]. No entanto, nenhum efeito principal significativo da administração de $A\beta_{1-40}$ [$F(1,16) = 0,07$, $p = 0,79$] foi detectado. O teste *post hoc* indicou que camundongos submetidos ao exercício físico apresentaram maior número de células de Paneth em comparação ao grupo controle ($p < 0,01$). A administração de $A\beta_{1-40}$ mostrou uma tendência ($p = 0,09$) para diminuir o número destas células em comparação com o grupo de controle. A **Fig 24F** mostra os efeitos da corrida em esteira e da administração de $A\beta_{1-40}$ na profundidade da cripta. A ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo da corrida em esteira ([$F(1,16) = 18,17$, $p < 0,01$]), um efeito principal significativo da administração de $A\beta_{1-40}$ ([$F(1,16) = 5,40$, $p < 0,05$]), mas nenhum efeito significativo da interação da administração de $A\beta_{1-40}$ x corrida em esteira ([$F(1,16) = 0,09$, $p = 0,76$]). O teste *post hoc* indicou que camundongos submetidos ao exercício físico apresentaram maior profundidade de cripta em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). A administração de $A\beta_{1-40}$ mostrou uma tendência ($p = 0,08$) para uma menor profundidade da cripta em comparação com o grupo de controle. Além disso, os camundongos exercitados submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ apresentaram maior profundidade da cripta quando comparados com os animais sedentários submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ ($p < 0,01$).

Figura 24 - Efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico em esteira sobre parâmetros morfológicos do duodeno

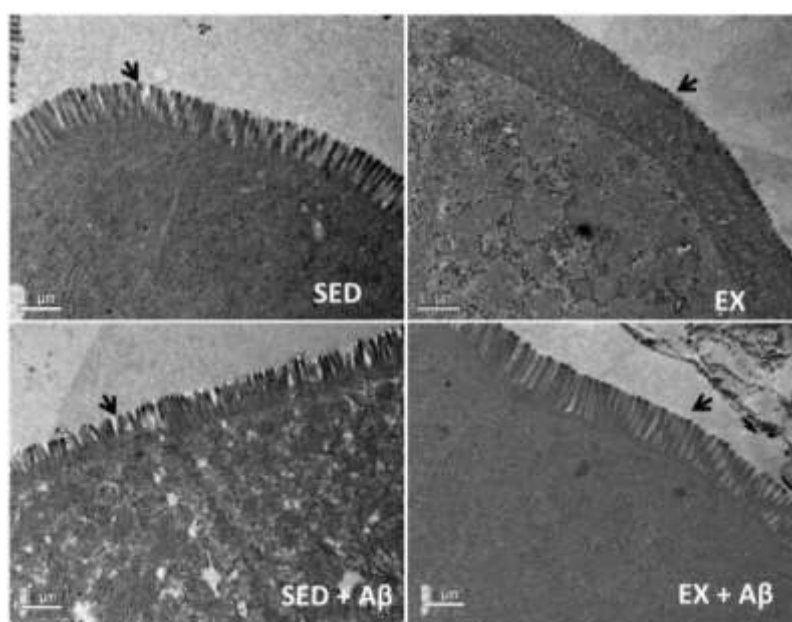


Legenda: (A) Fotomicrografias representativas dos efeitos da administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico em esteira sobre parâmetros morfológicos do duodeno: (B) comprimento das vilosidades, (C) largura das vilosidades, (D) número de células caliciformes/vilosidade, (E) número de células de Paneth/cripta, (F) profundidade da cripta. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 20 x (barra de escala = 100 µm) ou 40 x (barra de escala = 50 µm; inserção). Os resultados estão representados como média + S.E.M. ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo tratado com veículo; ## $p < 0,01$ em comparação com o grupo sedentário submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ (ANOVA de duas vias seguido pelo teste post hoc de Duncan).

II.4.3 Efeito do exercício físico em esteira e/ou da administração de $A\beta_{1-40}$ na morfologia das microvilosidades do duodeno avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão

A **Fig. 25** ilustra fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de uma secção transversal do epitélio do duodeno de camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico. Em relação à morfologia das microvilosidades, diferenças visíveis no comprimento dessas estruturas podem ser observadas entre os grupos, com camundongos exercitados apresentando um maior comprimento das microvilosidades em relação aos outros grupos. É possível observar as microvilosidades epiteliais obtidas de camundongos sedentários submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ apresentam-se mais curtas e com uma heterogeneidade no seu comprimento, mostrando um empacotamento desordenado (indicado por setas no painel SED + $A\beta$).

Figura 25- Efeito do exercício físico em esteira e/ou da administração de $A\beta_{1-40}$ na morfologia das microvilosidades do duodeno avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão

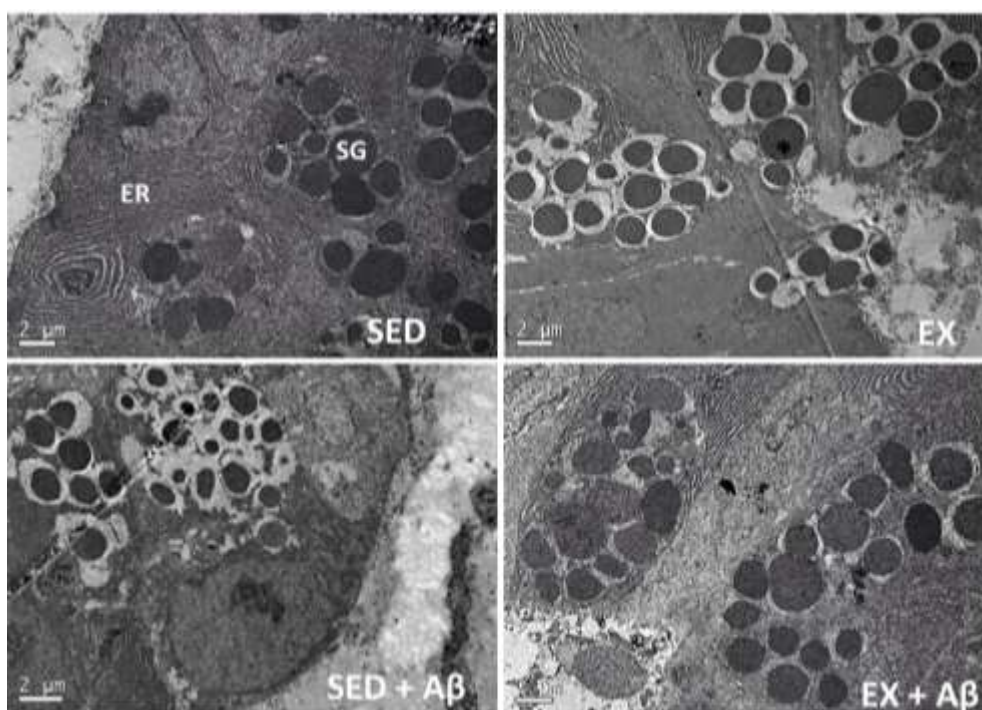


Legenda: Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de uma secção transversal do epitélio do duodeno de camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico. SED, sedentário; EX, exercitado; SED + $A\beta$, animais sedentários submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$; EX + $A\beta$ animais exercitados submetidos a administração de $A\beta_{1-40}$. As setas mostram as microvilosidades. As imagens foram obtidas com uma ampliação de 15.000 x (barra de escala = 1 μ m).

II.4.4 Efeito do exercício físico em esteira e/ou da administração de $A\beta_{1-40}$ na morfologia das células de Paneth no duodeno avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão

A **Fig. 26** mostra fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de células de Paneth a partir do duodeno de camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico. Estas células contêm grânulos de secreção com um núcleo denso rodeado por um halo periférico. É possível observar que a administração de $A\beta_{1-40}$ causou uma redução no diâmetro dos grânulos de secreção, bem como um halo periférico aumentado, uma alteração ultraestrutural não observada nas fotomicrografias obtidas de camundongos exercitados que receberam administração de $A\beta_{1-40}$.

Figura 26 - Efeito do exercício físico em esteira e/ou da administração de $A\beta_{1-40}$ na morfologia das células de Paneth no duodeno avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão

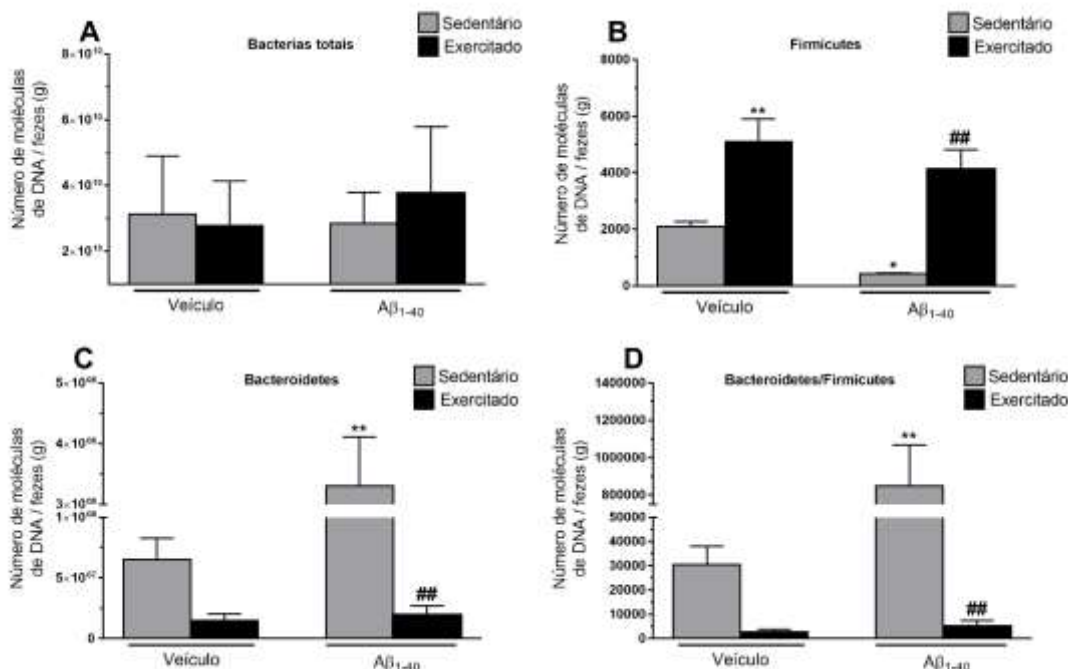


Legenda: Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão de células de Paneth no duodeno de camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico SED, sedentário; EX, exercitado; SED + $A\beta$, animais sedentários submetidos a administração de $A\beta_{1-40}$; EX + $A\beta$ animais exercitados submetidos a administração de $A\beta_{1-40}$. SG = grânulos de secreção; ER = retículo endoplasmático. As imagens foram tiradas com uma ampliação de 5.000 x (barra de escala = 2 μ m).

II.4.5 Efeito do exercício físico em esteira e / ou da administração de A β ₁₋₄₀ na abundância de bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes

Os resultados apresentados na **Fig. 27** mostram os efeitos da corrida em e/ou administração de A β ₁₋₄₀ em relação as bactérias totais e dos filos Firmicutes e Bacteroidetes presentes no conteúdo fecal. Em relação ao número total de bactérias ilustradas na **Fig. 27A**, a ANOVA de duas vias não revelou nenhum efeito significativo da corrida em esteira ([F (1,15) = 0,22, p = 0,64]); administração de A β ₁₋₄₀ ([F (1,15) = 0,18 p = 0,67] e administração de A β ₁₋₄₀ x esteira ([F (1,15) = 0,43, p = 0,52]). Em relação ao filo Firmicutes ilustrado na **Fig 27B**, a ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo do protocolo de corrida em esteira ([F (1,16) = 46,16, p < 0,01]) e da administração de A β ₁₋₄₀ ([F (1,16) = 5,86 p < 0,05], mas não foi observada interação significativa da interação entre administração de A β ₁₋₄₀ x corrida em esteira ([F (1,16) = 0,77, p = 0,39]. A análise *post hoc* mostrou uma diminuição na abundância do filo Firmicutes no grupo de animais expostos à administração de A β ₁₋₄₀ (p < 0,05), no entanto o exercício físico foi capaz de aumentar Firmicutes em camundongos tratados com veículo (p < 0,01), bem como foi capaz de prevenir o declínio neste parâmetro causado por A β ₁₋₄₀ (p < 0,01). **Fig 27C**, a ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo de corrida em esteira ([F (1,12) = 18,72, p < 0,01]), administração de A β ₁₋₄₀ ([F (1,12) = 10,45, p < 0,01] e da interação entre administração de A β ₁₋₄₀ x corrida em esteira ([F (1,12) = 9,80, p < 0,01]). A análise *post hoc* revelou aumento na abundância de bactérias do filo Bacteroidetes no grupo de animais expostos à administração de A β ₁₋₄₀ (p < 0,01). No entanto, o exercício físico foi capaz de prevenir o aumento causado pelo A β ₁₋₄₀ (p < 0,01). A **Fig 27D** mostra a influência da corrida em esteira e da administração do A β ₁₋₄₀ na relação Bacteroidetes / Firmicutes. A ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo da corrida em esteira ([F (1,12) = 15,35, p < 0,01]), da administração do A β ₁₋₄₀ ([F (1,12) = 13,61, p < 0,01] e da interação entre administração do A β ₁₋₄₀ x corrida em esteira ([F (1,12) = 13,46, p < 0,01]. Análise *post hoc* revelou que a administração do A β ₁₋₄₀ aumentou esta razão e o protocolo de exercício físico de corrida em esteira foi capaz de prevenir o aumento desse parâmetro.

Figura 27- Efeito do exercício físico em esteira e / ou da administração de A β 1-40 na abundância de bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes



Legenda: Efeitos da administração de A β 1-40 e/ou exercício físico na quantidade de DNA de bactérias no conteúdo fecal (A) total de bactérias (B) filo Firmicutes e (C) filo Bacteroidetes (D) Bacteroidetes/ Firmicutes (n = 3-5 animais/grupo). Barras representam médias + S.E.M. * p<0,05, ** p < 0,01 quando comparado com o grupo tratado com veículo; ## p < 0,01 em comparação com o grupo sedentário exposto a administração de A β 1-40 (ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Duncan).

A **Tabela 2** mostra as correlações significativas de Pearson entre o tempo de imobilidade no TSC e todos os parâmetros morfológicos avaliados pela coloração de H&E, bem como com a abundância de Firmicutes e Bacteroidetes. Além disso, o tempo gasto na TFUF mostrou correlação significativa com o tempo de imobilidade no TSC e com todos os parâmetros morfológicos avaliados pela coloração H&E, bem como com a abundância de Firmicutes e Bacteroidetes.

Tabela 2 - Correlações de Pearson entre diferentes parâmetros avaliados

Parâmetros	TSC	TFUF
Comprimento da vilosidade	- 0.77**	0.88**
Largura da vilosidade	- 0.77**	0.80**
Número de células caliciformes	- 0.84**	0.84**
Número de células de Paneth	- 0.83**	0.86**
Profundidade da cripta	- 0.73**	0.77**
Firmicutes	- 0.86**	0.90**
Bacteroidetes	0.89**	- 0.80**

** p < 0.01. Correlações significativas também foram observadas entre o TSC e o TFUF ($r = -0,94$, $p < 0,01$) e entre as células de Paneth e a profundidade da cripta ($0,69$, $p < 0,01$). Não foi observada correlação significativa entre o número de células de Paneth e a abundância de Firmicutes ($r = 0,46$, $p = 0,07$), mas uma correlação significativa foi observada entre o número de células de Paneth e a abundância de Bacteroidetes ($r = 0,50$, $p < 0,05$). Coeficiente de correlação = r.

II.5 DISCUSSÃO

No presente estudo demonstramos que o exercício físico foi capaz de prevenir o comportamento tipo-depressivo induzido por $A\beta_{1-40}$ no TSC e o prejuízo na atividade de busca de recompensa no TFUF em camundongos machos. Considerando que a literatura recente reporta que a disfunção intestinal está relacionada com depressão e DA (Vogt *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2018; Serra *et al.*, 2019), vários parâmetros indicativos da função intestinal também foram analisados. Nós fornecemos evidências de que o exercício físico foi capaz de aumentar o comprimento e a largura das vilosidades, o número de células caliciformes e células de Paneth e a profundidade das criptas no duodeno, além de ser capaz de prevenir a diminuição do filo Firmicutes e aumento do filo Bacteroidetes e da relação Bacteroidetes/Firmicutes causados pela administração do $A\beta_{1-40}$. Além disso, fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão sugerem que o exercício físico aumentou o comprimento dos microvilosidades dos enterócitos, bem como o diâmetro dos grânulos de secreção das células de Paneth, enquanto a

administração de $A\beta_{1-40}$ causou efeitos opostos que foram prevenidos pelo protocolo de exercício físico em esteira.

Um aumento significativo no tempo de imobilidade foi observado em camundongos submetidos ao TSC 10 dias após a administração de $A\beta_{1-40}$, indicando que a exposição a $A\beta_{1-40}$ resultou no desenvolvimento de comportamento tipo-depressivo. Nosso grupo de pesquisa e outros já demonstraram anteriormente que o mesmo protocolo de administração de $A\beta_{1-40}$ (400 pmol/site, i.c.v.) causou comportamento tipo-depressivo em camundongos, quando avaliado no teste de nado forçado (Guerra De Souza *et al.*, 2018; Rosa *et al.*, 2019) e no TSC (Rosa *et al.*, 2018). Em contrapartida, o protocolo de exercício físico em esteira por 4 semanas foi capaz de diminuir o tempo de imobilidade no TSC e prevenir o aumento induzido pela administração de $A\beta_{1-40}$. Em um estudo anterior do nosso grupo, um resultado semelhante foi obtido no TNF em camundongos submetidos à mesma dose de $A\beta_{1-40}$ e ao mesmo protocolo de exercício físico em esteira (Rosa *et al.*, 2019), reforçando que esse protocolo de exercício físico em esteira tem a capacidade de provocar um efeito tipo-antidepressivo em camundongos. Além disso, como relatado anteriormente (Rosa *et al.*, 2019), confirmamos que $A\beta_{1-40}$ e/ou exercício físico não causam alteração na atividade locomotora de camundongos.

Observamos também que a administração de $A\beta_{1-40}$ resultou na diminuição do tempo gasto no farejamento de urina de camundongos fêmea na fase estro do ciclo estral no TFUF. Este resultado sugere de que a administração de $A\beta_{1-40}$ causou um comportamento tipo anedônico, uma vez que o tempo em que camundongos machos cheiram a urina das fêmeas na fase estro do ciclo estral tem sido usado para avaliar um comportamento de busca de recompensa, considerando que o paradigma TFUF é baseado na atração de roedores machos por feromônios presentes na urina do sexo oposto (Malkesman *et al.*, 2010). Tem sido relatado que camundongos preferem farejar uma haste flexível embebida em urina de fêmeas na fase estro do ciclo estral do que um embebido em água (Malkesman *et al.*, 2010). Considerando que a anedonia é um sintoma característico da depressão (Winer *et al.*, 2019), esse resultado reforça a proposta de que o protocolo experimental de administração de $A\beta_{1-40}$ utilizado no presente estudo é útil para estudar os mecanismos subjacentes à comorbidade entre DA e depressão, como proposto anteriormente (Rosa *et al.*, 2019). Além disso, fornecemos evidências sobre os efeitos benéficos do exercício físico no comportamento relacionado à depressão/anedonia, uma vez que a exposição a 4 semanas de exercício físico em esteira

foi capaz de prevenir o comprometimento no TFUF provocado pela administração de $A\beta_{1-40}$. Além disso, o exercício físico em esteira, por si só, foi capaz de aumentar o tempo gasto com farejamento de urina feminina, sugerindo que esse protocolo de exercício físico induz um comportamento do tipo hedônico.

Considerando que a influência da saúde intestinal nas respostas comportamentais relacionadas ao humor tem sido relatada (Burokas *et al.*, 2017; Jianguo *et al.*, 2019), investigamos se a administração de $A\beta_{1-40}$ e o exercício físico em esteira poderiam afetar alguns parâmetros intestinais, que podem ter influenciado os parâmetros comportamentais analisados no presente estudo, sendo eles: a) comprimento e largura das vilosidades no duodeno; b) número de células caliciformes/vilosidade e células de Paneth/cripta, c) profundidade da cripta no duodeno; d) microscopia eletrônica de transmissão das microvilosidades e de células de Paneth no duodeno; e) enriquecimento de bactérias dos filos Firmicutes e Bacteroidetes no conteúdo fecal.

A comunicação entre o intestino e o cérebro é bidirecional entre o SNC e a periferia, envolvendo o sistema endócrino (eixo HPA), o sistema imunológico (citocinas e quimiocinas) e o sistema nervoso autônomo. Os componentes dos sistemas autonômicos, simpáticos e parassimpáticos conduzem os sinais transmitidos pelos tratos do SNC entéricos, espinhais e vagais e sinais eferentes do SNC para a barreira intestinal (Dinan e Cryan, 2017b).

O intestino delgado é onde a maioria dos produtos da hidrólise dos macronutrientes são absorvidos por transportadores específicos localizados na membrana de borda em escova dos enterócitos. Essas células possuem numerosas microvilosidades que desempenham um papel essencial para aumentar a área de superfície disponível para absorção (Desesso e Jacobson, 2001). Considerando que a influência do exercício físico e $A\beta_{1-40}$ na morfologia gastrointestinal é pouco conhecida, o primeiro parâmetro aqui analisado foi a medida do comprimento das vilosidades do duodeno em camundongos exercitados ou sedentários que receberam administração i.c.v. de $A\beta_{1-40}$ ou veículo. Mostramos que a prática do protocolo de exercício físico em esteira por 4 semanas aumentou o comprimento das vilosidades, independentemente de os animais terem sido expostos ao $A\beta_{1-40}$. Considerando que uma vilosidade intestinal mais alta pode proporcionar uma melhor absorção intestinal, esse resultado sugere que o exercício físico em esteira poderia ter contribuído para melhorar a absorção intestinal em camundongos. Em consonância com esses dados, foi relatado anteriormente que a natação (30 min/dia/3x

semana) aumentou o comprimento das vilosidades no jejuno de ratos (Gomes *et al.*, 2016).

Além disso, a largura das vilosidades foi maior em camundongos exercitados quando comparados com seus pares sedentários, como mostrado pela coloração H&E. A administração de A β ₁₋₄₀ reduziu a largura das vilosidades em comparação com o grupo controle, um efeito prevenido pela prática de exercício físico. Esse resultado reforça que o exercício físico, por si só, pode melhorar a absorção intestinal de nutrientes no duodeno, além de proteger contra uma possível disfunção nesse parâmetro causada pela administração de A β ₁₋₄₀. Mostramos que o comprimento vilosidade e a largura no duodeno estavam negativamente correlacionados com o tempo de imobilidade na TSC e positivamente correlacionados com o tempo gasto com farejamento no TFUF, sugerindo que esses parâmetros morfológicos do duodeno podem exercer influência sobre parâmetros comportamentais relacionados à depressão.

Em relação às microvilosidades presentes na borda dos enterócitos, as fotomicrografias de uma secção transversal do epitélio do duodeno mostram que o protocolo de exercício físico aumentou o comprimento dessas estruturas. Por outro lado, a administração de A β ₁₋₄₀ causou redução no comprimento das microvilosidades no duodeno, um achado que não foi observado quando os camundongos foram previamente submetidos à corrida em esteira. Este achado reforça a suposição de que camundongos expostos ao A β ₁₋₄₀ apresentam menor capacidade de absorção de nutrientes no duodeno, uma alteração prevenida pelo exercício físico.

Em relação ao número de células caliciformes por vilosidade no duodeno, também observamos que o protocolo de corrida em esteira aumentou o número dessas células tanto em animais que foram submetidos à administração de A β ₁₋₄₀ ou veículo. As células caliciformes produzem mucinas, que são proteínas altamente glicosiladas que constituem uma parte significativa da proteção epitelial intestinal, formando uma densa camada protetora de muco. Essa camada mantém a hidratação da superfície e reduz o estresse mecânico, além de limitar o acesso de toxinas de maior peso molecular à mucosa e impedir a penetração de bactérias intestinais através da barreira epitelial intestinal (Kim e Ho, 2010; Allaire *et al.*, 2018). Essas células emergiram como reguladores chave da homeostase intestinal na interface microbiota-hospedeiro no trato gastrointestinal, pois além de sua capacidade de secretar mucina, também secretam produtos vitais na promoção da defesa da saúde do intestino (Allaire *et al.*, 2018). Portanto, o maior número

dessas células induzidas pelo exercício físico pode representar um mecanismo de defesa intestinal desencadeado pela prática de atividade física, podendo contribuir para a homeostase intestinal. Embora não estatisticamente significativo, uma tendência a uma diminuição dessas células foi observada em camundongos sedentários expostos ao A β ₁₋₄₀, o que pode ter contribuído para causar uma disfunção intestinal nesses animais. Uma correlação negativa significativa entre as células caliciformes e o tempo de imobilidade no TSC, bem como uma correlação negativa entre essas células e o TFUT podem ser indicativos de que essas células desempenham um papel importante na homeostase do intestino, que em conjunto podem influenciar positivamente os resultados comportamentais relacionados ao humor.

Outro parâmetro avaliado no presente estudo foi o número de células de Paneth, que são células epiteliais do intestino delgado localizadas na parte inferior das criptas intestinais. Essas células produzem peptídeos antimicrobianos entéricos, como alfa-defensinas, que desempenham um papel importante na imunidade inata do intestino delgado (Gassler, 2017). Neste estudo foi possível observar que os animais expostos ao protocolo de exercício físico, independente da administração de A β ₁₋₄₀, apresentaram aumento no número dessas células, como demonstrado pela coloração de H&E, reforçando que a prática de exercício físico contribui para um melhor funcionamento dos mecanismos de defesa intestinal. Reforçando ainda mais essa suposição, a fotomicrografia das células de Paneth presentes no duodeno obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostram que o exercício físico aumentou o diâmetro dos grânulos de secreção destas células, enquanto a administração de A β ₁₋₄₀ reduziu esse parâmetro, um efeito prevenido pelo protocolo de exercício físico em esteira. A administração oral de probióticos (*Lactobacillus casei* Lc 431 e *L. paracasei* Lp 1518) por 42 dias em camundongos foi recentemente relatada como capaz de aumentar as células de Paneth na base da cripta intestinal e aumentar o número de grânulos por célula em relação a aqueles camundongos que receberam uma dieta convencional (Cazorla *et al.*, 2018). Os probióticos têm sido reconhecidos como uma nova estratégia que promove comportamento tipo-antidepressivo em camundongos (Mcvey Neufeld *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018), além de serem úteis no manejo da depressão em humanos (Huang *et al.*, 2016). É interessante notar que o exercício físico em esteira provocou efeitos similares aos probióticos em relação às células de Paneth.

Tem sido relatado que diversas condições patológicas associadas com maior susceptibilidade à depressão e à DA, como deficiência de vitamina D, diabetes e obesidade podem prejudicar a função das células de Paneth e sua capacidade de expressar peptídeos antimicrobianos, como α -defensinas (Laursen e Belknap, 1986; Su *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2016). Por outro lado, uma única sessão de natação de 30 minutos em camundongos foi eficaz em aumentar a expressão de vários peptídeos antimicrobianos controlados por células de Paneth e atenuar a disfunção da barreira intestinal induzida por estresse crônico (Luo *et al.*, 2014). Apesar da função das células de Paneth ser comprometida em várias condições patológicas, o número dessas células parece não estar necessariamente relacionado à sua função. Aqui mostramos que a administração de $A\beta_{1-40}$ não alterou significativamente o número de células de Paneth no duodeno, mas uma tendência em reduzir essas células foi observada em camundongos expostos à $A\beta_{1-40}$.

A profundidade da cripta foi outro parâmetro morfológico analisado no duodeno. Semelhante ao resultado encontrado para o número de células caliciformes e células de Paneth, este parâmetro também foi aumentado no protocolo de corrida em esteira, enquanto uma tendência a uma diminuição na profundidade das criptas foi observada em camundongos sedentários expostos a $A\beta_{1-40}$. Porém em camundongos exercitados expostos a $A\beta_{1-40}$ exercitados, este parâmetro foi semelhante ao grupo controle. Foi observada uma correlação negativa entre a profundidade da cripta e o tempo de imobilidade no TSC, sugerindo que o comportamento do tipo-depressivo (caracterizado pelo maior tempo de imobilidade) está associado a uma cripta duodenal mais curta. Este resultado pode estar relacionado a um menor mecanismo de defesa devido ao menor número de células de Paneth causadas pela administração de $A\beta_{1-40}$. Corroborando este resultado, foi encontrada uma correlação positiva entre a profundidade da cripta e o tempo gasto com farejamento no TFUF. Vale ressaltar que o protocolo de exercício em esteira foi capaz de aumentar a profundidade de cripta, assim como o número de células de Paneth, um efeito paralelo à sua capacidade de causar efeito tipo-antidepressivo. Em conjunto, esses achados sugerem que uma maior capacidade de defesa no duodeno pode estar associada à melhora do comportamento relacionado à depressão.

Como previamente demonstrado em camundongos (Troughton e Trier, 1969; Satoh *et al.*, 1990), mostramos nas fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão que os grânulos das células de Paneth de camundongos são bipartidos, isto é, apresentam um núcleo central e um halo periférico. O núcleo é composto por um

complexo polissacarídeo-proteína, enquanto o halo é composto de mucopolissacarídeo ácido (Hampton, 1965). É possível observar que a administração de A β ₁₋₄₀ causou uma redução no diâmetro dos grânulos de secreção. Todas essas alterações ultraestruturais foram prevenidas pelo exercício físico.

Nosso estudo demonstrou que camundongos expostos a A β ₁₋₄₀ tiveram uma diminuição na abundância do filo Firmicutes em seus conteúdos fecais. De forma semelhante, amostras fecais de camundongos transgênicos para a proteína precursora amiloide (APP) (modelo da doença de AD) apresentaram uma diminuição em Firmicutes quando comparados a amostras obtidas de camundongos do tipo selvagem (Harach *et al.*, 2017). Corroborando com esses achados, um estudo que avaliou as alterações da microbiota intestinal em participantes com DA encontrou uma diminuição no filo Firmicutes na microbiota desses indivíduos (Vogt *et al.*, 2017). Além disso, uma redução na abundância do filo Firmicutes também foi observada em pacientes com depressão (Huang *et al.*, 2019). Ainda, camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção (modelo animal de depressão) apresentaram redução da abundância de Firmicutes nas fezes quando comparados ao grupo controle, um efeito revertido pelo extrato de alecrim, o qual também foi capaz de causar efeito tipo-antidepressivo (Guo *et al.*, 2018).

Em relação à influência do exercício físico em esteira sobre o filo Firmicutes, mostramos que esse protocolo aumentou a abundância de bactérias deste filo em comparação com camundongos sedentários. Este resultado está de acordo com um aumento na abundância de Firmicutes observado após 4 semanas de treinamento em ratos obesos (Petritz *et al.*, 2014) e a maior abundância de espécies de bactérias do filo Firmicutes em amostras de conteúdo fecal de camundongos submetidos a 6 semanas de corrida em esteira (Lambert *et al.*, 2015). Além disso, mostramos que o protocolo de exercício físico utilizado no presente estudo foi capaz de prevenir a diminuição das bactérias do filo Firmicutes induzida por A β ₁₋₄₀.

Os principais produtos da microbiota são os ácidos graxos de cadeia curta, incluindo o butirato, uma molécula funcionalmente produzida no intestino dos mamíferos pela fermentação da fibra alimentar (Stilling *et al.*, 2016). Tem sido proposto que o butirato exerce um papel benéfico contra a depressão e doenças neurodegenerativas (Stilling *et al.*, 2016). No ambiente gastrointestinal, os produtores predominantes de butirato são bactérias do filo Firmicutes (Rowland *et al.*, 2018). Portanto, considerando que o exercício físico em esteira aumentou a abundância deste filo e protegeu contra a

diminuição induzida por $A\beta_{1-40}$, supomos que ele possa ser um alvo importante envolvido nas alterações comportamentais avaliados no presente estudo. Nesse sentido, nosso estudo mostrou uma correlação negativa entre a abundância de Firmicutes no conteúdo fecal (indicativo de menor número de bactérias desse filo) e o tempo de imobilidade no TSC e uma correlação positiva entre Firmicutes e tempo gasto com farejamento no TFUF.

No presente estudo, a abundância aumentada de filo Bacteroidetes também foi observada em camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$. De forma semelhante, um estudo realizado com pacientes com DA mostrou que esses indivíduos apresentam uma maior abundância de Bacteroidetes na microbiota fecal em comparação com indivíduos saudáveis (Vogt *et al.*, 2017). Da mesma forma, um aumento em Bacteroidetes foi relatado em pacientes com depressão (Jiang *et al.*, 2015). Além disso, o estresse por restrição crônica causou um aumento na abundância de Bacteroidetes nas fezes, um efeito neutralizado pelo extrato de alecrim (Guo *et al.*, 2018). Corroborando com esses resultados, observamos uma correlação positiva entre Bacteroidetes e o tempo de imobilidade no TSC e uma correlação negativa entre a abundância de Bacteroidetes e o tempo gasto com farejamento no TFUF. Embora o exercício físico em esteira não tenha alterado este parâmetro em camundongos sedentários, ele foi capaz de prevenir o aumento da abundância de bactérias do filo Bacteroidetes e abolir o aumento na relação Bacteroidetes/Firmicutes induzida pela administração de $A\beta_{1-40}$. Dados da literatura sobre a influência do exercício físico na abundância de Bacteroidetes têm proporcionado resultados divergentes. Alguns estudos reportam resultados similares ao do nosso grupo, mostrando uma ausência de alteração na abundância desse filo ou na relação Bacteroidetes/Firmicutes em ratos submetidos à roda de corrida voluntária (Liu *et al.*, 2015) ou em camundongos submetidos à roda de corrida voluntária ou corrida em esteira (Allen *et al.*, 2015), mas outros mostraram maior abundância de Bacteroidetes (Evans *et al.*, 2014) ou redução na abundância de bactérias deste filo (Kang *et al.*, 2014) após a prática de exercício físico.

Portanto, os resultados aqui apresentados são indicativos de que uma única administração de $A\beta_{1-40}$ foi suficiente para causar alterações na composição da microbiota de forma semelhante às alterações observadas em indivíduos com DA e depressão. O efeito protetor do exercício físico em esteira por 4 semanas contra esses déficits induzidos por $A\beta_{1-40}$ pode, pelo menos em parte, explicar sua capacidade de prevenir o comportamento tipo-antidepressivo causado pelo exercício físico. No entanto, estudos

adicionais são necessários para caracterizar os gêneros de bactérias afetadas por essas intervenções.

II.6 CONCLUSÃO

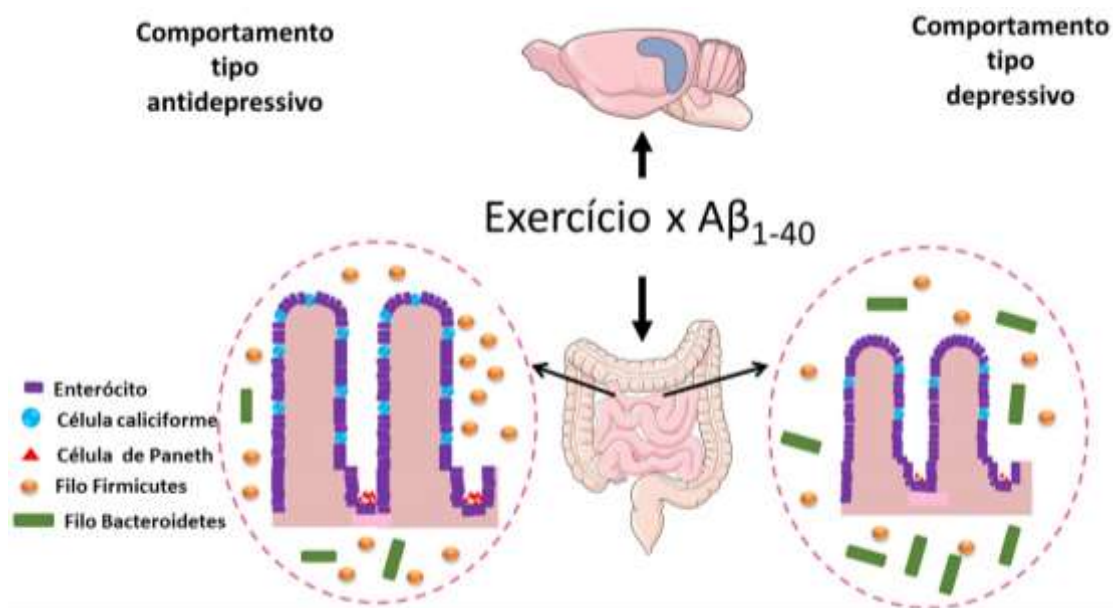
Os resultados deste capítulo sumarizados na **Tabela 3** indicam que a corrida em esteira por 4 semanas provoca um efeito tipo-antidepressivo em camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ ou veículo. Além disso, a corrida em esteira causou várias alterações morfológicas no duodeno e na composição da microbiota. Tais alterações podem manter a homeostase intestinal, protegendo contra a disfunção intestinal e o comportamento tipo-depressivo induzido pela administração de $A\beta_{1-40}$. Análises de correlação entre os parâmetros morfológicos, bem como a abundância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes e os resultados comportamentais sugerem que alterações na morfologia do duodeno e da microbiota (indicativo de disfunção intestinal) contribuem para o desenvolvimento de um fenótipo-depressivo. Coletivamente, os resultados sugerem um papel fundamental do eixo cérebro-intestino para a depressão/DA e o efeito protetor do exercício nessa comorbidade, conforme ilustrado na **Figura 28**.

Tabela 3- Resumo dos resultados obtidos no capítulo II

Parâmetros	Grupos		
	Exercitado	A β sedentário	A β + Exercício
Tempo de Imobilidade	↓	↑	≠
Tempo de farejamento	↑	↓	≠
Cruzamentos	=	=	=
Comprimento das vilosidades	↑	=	≠
Largura das vilosidades	↑	↓	≠
Células caliciformes	↑	p = 0,08	≠
Célula de Paneth	↑	p = 0,09	≠
Profundidade das criptas	↑	p = 0,08	≠
Bactérias totais	=	=	=
Firmicutes	↑	↓	≠
Bacteroidetes	↓	↑	≠
Bacteroidetes/Firmicutes	=	↑	≠

Legenda: ↑ aumento em relação ao grupo controle; ↓ redução em relação ao grupo controle; = sem diferença significativa em relação ao grupo controle; ≠ prevenção do efeito em relação ao grupo sedentário A β .

Figura 28- Representação esquemática dos resultados comportamentais e morfológicos obtidos no Capítulo II



Legenda: Os camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ apresentaram comportamento tipo-depressivo acompanhado de uma diminuição da largura das vilosidades, além de tendência em diminuir a quantidade de células de Paneth, células caliciformes e profundidade das criptas. Ocorreram também alterações ultraestruturais nas microvilosidades do epitélio duodenal em camundongos sedentários expostos ao $A\beta_{1-40}$, com microvilosidades mais curtas e com um padrão heterogêneo de comprimento e uma organização desordenada. A administração de $A\beta_{1-40}$ também causou uma redução do diâmetro dos grânulos secretórios presentes nas células de Paneth, bem como um maior halo periférico nestas células. Ocorreu também a diminuição da abundância de bactérias do filo Firmicutes e aumento do filo Bacteroidetes. Todos esses parâmetros foram revertidos pela prática de exercício físico. (Fonte: do Autor, com algumas imagens obtidas do *Mind the Graph*).

5. CONCLUSÃO GERAL

- Camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ apresentaram comportamento tipo- depressivo e ansioso, diminuição de BDNF e fosforilação de mTOR no hipocampo, bem como diminuição da proliferação e sobrevivência celular no GD do hipocampo.
- Os camundongos submetidos à administração de $A\beta_{1-40}$ apresentaram diminuição da largura das vilosidades do duodeno. Ocorreram também alterações ultraestruturais nas microvilosidades do epitélio duodenal em camundongos sedentários expostos ao $A\beta_{1-40}$, com microvilosidades mais curtas e com um padrão heterogêneo de comprimento e uma organização desordenada.
- A administração de $A\beta_{1-40}$ também causou uma redução do diâmetro dos grânulos secretórios presentes nas células de Paneth, bem como um maior halo periférico nestas células.
- Ocorreu também a diminuição da abundância de bactérias do filo Firmicutes e aumento do filo Bacteroidetes e aumento da razão Bacteroidetes/Firmicutes.
- Todos esses parâmetros foram revertidos pelo protocolo de exercício físico.

6. PERSPECTIVAS

- Avaliar a influência do nervo vago no efeito tipo-antidepressivo do exercício físico.
- Avaliar o efeito tipo-antidepressivo do exercício físico associado com administração de probióticos.
- Avaliar parâmetros inflamatórios no intestino, soro e hipocampo após protocolo de exercício físico.
- Avaliar efeito tipo-antidepressivo do exercício físico sobre o eixo intestino-microbiota-cérebro em um modelo de estresse induzido pela administração de corticosterona.

REFERÊNCIAS

- ALLAIRE, J. M. et al. Frontline defenders: goblet cell mediators dictate host-microbe interactions in the intestinal tract during health and disease. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 314, n. 3, p. G360-G377, 2018.
- ALLEN, J. M. et al. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. **J Appl Physiol (1985)**, v. 118, n. 8, p. 1059-66, 2015.
- ANACKER, C. Adult hippocampal neurogenesis in depression: behavioral implications and regulation by the stress system. **Curr Top Behav Neurosci**, v.18, p.25-43, 2014.
- ANAND, A. et al. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. **Eur J Pharmacol**, v. 815, p. 364-375, 2017.
- ASSINI, F. L.; DUZZIONI, M.; TAKAHASHI, R. N. Object location memory in mice: pharmacological validation and further evidence of hippocampal CA1 participation. **Behav Brain Res**, v. 204, n. 1, p. 206-11, Dec 1 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ALZHEIMER. O que é Alzheimer? Disponível em <<http://abraz.org.br/web/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer/>>.
- AYABE, T. et al. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. **Nat Immunol**, v. 1, n. 2, p. 113-8, 2000.
- BAGOT, R. C. et al. Ventral hippocampal afferents to the nucleus accumbens regulate susceptibility to depression. **Nat Commun**, v. 6, p. 7062, 2015.
- BALIETTI, M.; GIULI, C.; CONTI, F. Peripheral Blood Brain-Derived Neurotrophic Factor as a Biomarker of Alzheimer's Disease: Are There Methodological Biases? **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 8, p. 6661-6672, 2018.
- BARNES, D. E. et al. Midlife vs late-life depressive symptoms and risk of dementia: differential effects for Alzheimer disease and vascular dementia. **Arch Gen Psychiatry**, v. 69, n. 5, p. 493-8, 2012.
- BERCHTOLD, N. C.; KESSLAK, J. P.; COTMAN, C. W. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor gene regulation by exercise and the medial septum. **J Neurosci Res**, v. 68, n. 5, p. 511-21, 2002.

- BERCIK, P. et al. The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. **Neurogastroenterol Motil**, v. 23, n. 12, p. 1132-9, 2011.
- BERMON, S. et al. The microbiota: an exercise immunology perspective. **Exerc Immunol Rev**, v. 21, p. 70-9, 2015.
- BINDER, D. K.; SCHARFMAN, H. E. Brain-derived neurotrophic factor. **Growth Factors**, v. 22, n. 3, p. 123-31, 2004.
- BIRCHENOUGH, G. M. et al. New developments in goblet cell mucus secretion and function. **Mucosal Immunol**, v. 8, n. 4, p. 712-9, 2015.
- BOEHME, F. et al. Voluntary exercise induces adult hippocampal neurogenesis and BDNF expression in a rodent model of fetal alcohol spectrum disorders. **Eur J Neurosci**, v. 33, n. 10, p. 1799-811, 2011.
- BOLDRINI, M. et al. Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 6, p. 1068-77, 2013.
- BOLDRINI, M. et al. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 11, p. 2376-89, 2009.
- BONAZ, B.; BAZIN, T.; PELLISSIER, S. The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. **Front Neurosci**, v. 12, p. 49, 2018.
- BONFILI, L. et al. Microbiota modulation counteracts Alzheimer's disease progression influencing neuronal proteolysis and gut hormones plasma levels. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 2426, 2017.
- BREIT, S. et al. Vagus Nerve as Modulator of the Brain-Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. **Front Psychiatry**, v. 9, p. 44, 2018.
- BRITT, J. P. et al. Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. **Neuron**, v. 76, n. 4, p. 790-803, 2012.
- BUROKAS, A. et al. Targeting the Microbiota-Gut-Brain Axis: Prebiotics Have Anxiolytic and Antidepressant-like Effects and Reverse the Impact of Chronic Stress in Mice. **Biol Psychiatry**, v. 82, n. 7, p. 472-487, 2017.

BUS, B. A.; MOLENDIJK, M. L. The neurotrophic hypothesis of depression. **Tijdschr Psychiatr**, v. 58, n. 3, p. 215-22, 2016.

BYERS, A. L.; YAFFE, K. Depression and risk of developing dementia. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 6, p. 323-31, 2011.

CALLAGHAN, C. K.; ROUINE, J.; O'MARA, S. M. Exercise prevents IFN-alpha-induced mood and cognitive dysfunction and increases BDNF expression in the rat. **Physiol Behav**, v. 179, p. 377-383, 2017.

CAO, J. et al. Advances in developing novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease. **Mol Neurodegener**, v. 13, n. 1, p. 64, 2018.

CAPPA, S. F. The Quest for an Alzheimer Therapy. **Front Neurol**, v. 9, p. 108, 2018.

CARABOTTI, M. et al. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. **Ann Gastroenterol**, v. 28, n. 2, p. 203-209, 2015.

CARLSON, A. L. et al. Infant Gut Microbiome Associated With Cognitive Development. **Biol Psychiatry**, v. 83, n. 2, p. 148-159, 2018.

CASS, S. P. Alzheimer's Disease and Exercise: A Literature Review. **Curr Sports Med Rep**, v. 16, n. 1, p. 19-22, 2017.

CASTELLANI, R. J.; PERRY, G. Pathogenesis and disease-modifying therapy in Alzheimer's disease: the flat line of progress. **Arch Med Res**, v. 43, n. 8, p. 694-8, 2012.

CATTADORI, G. et al. Exercise and heart failure: an update. **ESC Heart Fail**, v.5, p. 222-232, 2018.

CAZORLA, S. I. et al. Oral Administration of Probiotics Increases Paneth Cells and Intestinal Antimicrobial Activity. **Front Microbiol**, v. 9, p. 736, 2018.

CENIT, M. C.; SANZ, Y.; CODONER-FRANCH, P. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. **World J Gastroenterol**, v. 23, n. 30, p. 5486-5498, 2017.

CHAI, H. et al. Antidepressant Effects of Rhodomyrtone in Mice with Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 157-164, 2019.

CHANG, W. H. et al. Relationship between Serum BDNF Levels and Depressive Mood in Subacute Stroke Patients: A Preliminary Study. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 10, 2018.

- CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nat Rev Neurosci**, v. 4, n. 4, p. 299-309, 2003.
- CHEN, B. et al. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v. 50, n. 4, p. 260-5, 2001.
- CHEN, H. H. et al. Overexpression of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus protects against post-stroke depression. **Neural Regen Res**, v. 10, n. 9, p. 1427-32, 2015.
- CHEN, J. et al. proBDNF Attenuates Hippocampal Neurogenesis and Induces Learning and Memory Deficits in Aged Mice. **Neurotox Res**, v. 29, n. 1, p. 47-53, 2016.
- CHEN, N. et al. Irisin, an exercise-induced myokine as a metabolic regulator: an updated narrative review. **Diabetes Metab Res Rev**, 2015.
- CHEN, X. et al. Administration of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Attenuates Abeta 1-42-Induced Alzheimer's Disease in Mice by Activating beta-Catenin Signaling. **Biomed Res Int**, v. 2019, p. 1431760, 2019.
- CHERNY, I. et al. The formation of Escherichia coli curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. **J Mol Biol**, v. 352, n. 2, p. 245-52, 2005.
- CHEUNG, S. G. et al. Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression. **Front Psychiatry**, v. 10, p. 34, 2019.
- CHI, S. et al. Depression in Alzheimer's disease: epidemiology, mechanisms, and management. **J Alzheimers Dis**, v. 42, n. 3, p. 739-55, 2014.
- CHIPKIN, S.R. et al. Exercise and diabetes. *Cardiol Clin*. **Cardiol Clin**, v. 19, p. 489-505, 2001.
- CHRISTENSEN, T. et al. Transcriptome differentiation along the dorso-ventral axis in laser-captured microdissected rat hippocampal granular cell layer. **Neuroscience**, v. 170, n. 3, p. 731-41, 2010.
- CLARK, A.; MACH, N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes. **J Int Soc Sports Nutr**, v. 13, p. 43, 2016.

- COLOMBO, P. J.; GALLAGHER, M. Individual differences in spatial memory and striatal ChAT activity among young and aged rats. **Neurobiol Learn Mem**, v. 70, n. 3, p. 314-27, 1998.
- CONLAN, S.; KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Species-level analysis of DNA sequence data from the NIH Human Microbiome Project. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47075, 2012.
- COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 6, p. 295-301, 2002.
- COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C.; CHRISTIE, L. A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 9, p. 464-72, 2007.
- CUSSOTTO, S. et al. The Neuroendocrinology of the Microbiota-Gut-Brain Axis: A Behavioural Perspective. **Front Neuroendocrinol**, v. 51, p. 80-101, 2018.
- DA FONSECA, V. S. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Prevents Depressive-Like Behaviors in Early-Symptomatic YAC128 Huntington's Disease Mice. **Mol Neurobiol**, v. 55, n. 9, p. 7201-7215, 2018.
- DALTON, A.; MERMIER, C.; ZUHL, M. Exercise influence on the microbiome-gut-brain axis. **Gut Microbes**, p. 1-14, 2019.
- DE OLIVEIRA, J. et al. Increased susceptibility to amyloid-beta-induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. **J Alzheimers Dis**, v. 41, n. 1, p. 43-60, 2014.
- DE PALMA, G. et al. The microbiota-gut-brain axis in gastrointestinal disorders: stressed bugs, stressed brain or both? **J Physiol**, v. 592, n. 14, p. 2989-97, 2014.
- DESESSO, J. M.; JACOBSON, C. F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. **Food Chem Toxicol**, v. 39, n. 3, p. 209-28, 2001.
- DESLANDES, A. et al. Exercise and mental health: many reasons to move. **Neuropsychobiology**, v. 59, n. 4, p. 191-8, 2009.
- DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. Brain-Gut-Microbiota Axis and Mental Health. **Psychosom Med**, v. 79, n. 8, p. 920-926, 2017a.

DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 46, n. 1, p. 77-89, 2017b.

DISHMAN, R. K. et al. Neurobiology of exercise. **Obesity (Silver Spring)**, v. 14, n. 3, p. 345-56, 2006.

DORSZEWSKA, J. et al. Molecular Basis of Familial and Sporadic Alzheimer's Disease. **Curr Alzheimer Res**, v. 13, n. 9, p. 952-63, 2016.

DOS SANTOS, V. V. et al. Neuropeptide Y (NPY) prevents depressive-like behavior, spatial memory deficits and oxidative stress following amyloid-beta (A β (1-40)) administration in mice. **Behav Brain Res**, v. 244, p. 107-15, 2013.

EBERT, A.; BAR, K. J. Emil Kraepelin: A pioneer of scientific understanding of psychiatry and psychopharmacology. **Indian J Psychiatry**, v. 52, n. 2, p. 191-2, 2010.

ELFVING, B. et al. Transient activation of mTOR following forced treadmill exercise in rats. **Synapse**, v. 67, n. 9, p. 620-5, 2013.

ELPHICK, D. A.; MAHIDA, Y. R. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. **Gut**, v. 54, n. 12, p. 1802-9, 2005.

ENGEL, F. A. et al. High-Intensity Interval Training Performed by Young Athletes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Front Physiol**, v. 9, p. 1012, 2018.

ENSARI, A.; MARSH, M. N. Exploring the villus. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench**, v. 11, n. 3, p. 181-190, 2018.

EPPERLY, T.; DUNAY, M. A.; BOICE, J. L. Alzheimer Disease: Pharmacologic and Nonpharmacologic Therapies for Cognitive and Functional Symptoms. **Am Fam Physician**, v. 95, n. 12, p. 771-778, 2017.

ERICKSON, K. I. et al. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. **J Neurosci**, v. 30, n. 15, p. 5368-75, 2010.

ERICKSON, K. I. et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 7, p. 3017-22, 2011.

EVANS, C. C. et al. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92193, 2014.

FANG, Z. H. et al. Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats. **Neurosci Res**, v. 76, n. 4, p. 187-94, 2013.

FANSELOW, M. S.; DONG, H. W. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 7-19, 2010.

FARMER, J. et al. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. **Neuroscience**, v. 124, n. 1, p. 71-9, 2004.

FARRELL, J. W., 3RD et al. Aerobic Exercise Supplemented With Muscular Endurance Training Improves Onset of Blood Lactate Accumulation. **J Strength Cond Res**, v. 32, n. 5, p. 1376-1382, 2018.

FELIX-ORTIZ, A. C.; TYE, K. M. Amygdala inputs to the ventral hippocampus bidirectionally modulate social behavior. **J Neurosci**, v. 34, n. 2, p. 586-95, 2014.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. et al. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. **Curr Neuropharmacol**, v. 14, n. 1, p. 101-15, 2016.

FIEST, K. M. et al. The Prevalence and Incidence of Dementia Due to Alzheimer's Disease: a Systematic Review and Meta-Analysis. **Can J Neurol Sci**, v. 43 Suppl 1, p. S51-82, 2016.

FOLCH, J. et al. Memantine for the Treatment of Dementia: A Review on its Current and Future Applications. **J Alzheimers Dis**, v. 62, n. 3, p. 1223-1240, 2018.

FORD, E. S. et al. Television watching and incident diabetes: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition-Potsdam Study. **J Diabetes**, v. 2, n. 1, p. 23-7, 2010.

FORSYTHE, P.; BIENENSTOCK, J.; KUNZE, W. A. Vagal pathways for microbiome-brain-gut axis communication. **Adv Exp Med Biol**, v. 817, p. 115-33, 2014.

FOSTER, J. A.; RINAMAN, L.; CRYAN, J. F. Stress & the gut-brain axis: Regulation by the microbiome. **Neurobiol Stress**, v. 7, p. 124-136, 2017.

FRANCO, R. et al. Potential of GPCRs to modulate MAPK and mTOR pathways in Alzheimer's disease. **Prog Neurobiol**, v. 149-150, p. 21-38, 2017.

FRIEDLAND, R. P.; CHAPMAN, M. R. The role of microbial amyloid in neurodegeneration. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 12, p. e1006654, 2017.

FROHLICH, E. E. et al. Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota-brain communication. **Brain Behav Immun**, v. 56, p. 140-55, 2016.

GALLOZA, J.; CASTILLO, B.; MICHEO, W. Benefits of Exercise in the Older Population. **Phys Med Rehabil Clin N Am**, v. 28, n. 4, p. 659-669, 2017.

GALTS, C. P. C. et al. Depression in neurodegenerative diseases: Common mechanisms and current treatment options. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 102, p. 56-84, 2019.

GARCIA-MESA, Y. et al. Oxidative Stress Is a Central Target for Physical Exercise Neuroprotection Against Pathological Brain Aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**, v. 71, n.1, p. 40-49, 2016.

GAREAU, M. G. et al. Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. **Gut**, v. 60, n. 3, p. 307-17, 2011.

GASSLER, N. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. **World J Gastrointest Pathophysiol**, v. 8, n. 4, p. 150-160, 2017.

GAUTHIER, S. et al. Management of behavioral problems in Alzheimer's disease. **Int Psychogeriatr**, v. 22, n. 3, p. 346-72, 2010.

GE, S. et al. Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. **J Physiol**, v. 586, n. 16, p. 3759-65, 2008.

GHOSH, H. S. Adult Neurogenesis and the Promise of Adult Neural Stem Cells. **J Exp Neurosci**, v. 13, p. 1179069519856876, 2019.

GIL-MOHAPEL, J. et al. Hippocampal neurogenesis levels predict WATERMAZE search strategies in the aging brain. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e75125, 2013.

GLENNER, G. G.; WONG, C. W. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. 1984. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 425, n. 3, p. 534-9, 2012.

GOMES, J. R.; FREITAS, J. R.; GRASSIOLLI, S. Effects of Physical Exercise on the Intestinal Mucosa of Rats Submitted to a Hypothalamic Obesity Condition. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 299, n. 10, p. 1389-96, 2016.

GRIFFIN, E. W. et al. Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. **Physiol Behav**, v. 104, n. 5, p. 934-41, 2011.

GUERRA DE SOUZA, A. C. et al. Agmatine attenuates depressive-like behavior and hippocampal oxidative stress following amyloid beta (A β 1-40) administration in mice. **Behav Brain Res**, v. 353, p. 51-56, 2018.

GUIDA, F. et al. Antibiotic-induced microbiota perturbation causes gut endocannabinoidome changes, hippocampal neuroglial reorganization and depression in mice. **Brain Behav Immun**, v. 67, p. 230-245, 2018.

GUO, Y. et al. Antidepressant Effects of Rosemary Extracts Associate With Anti-inflammatory Effect and Rebalance of Gut Microbiota. **Front Pharmacol**, v. 9, p. 1126, 2018.

GUZMAN-MARTINEZ, L. et al. Biomarkers for Alzheimer's disease. **Curr Alzheimer Res**, v. 16, n. 6, p. 518-528, 2019.

HAAKSMA, M. L. et al. Comorbidity and progression of late onset Alzheimer's disease: A systematic review. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0177044, 2017.

HAJIZADEH MALEKI, B.; TARTIBIAN, B. Combined aerobic and resistance exercise training for improving reproductive function in infertile men: a randomized controlled trial. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 42, n. 12, p. 1293-1306, 2017.

HAMPEL, H. et al. The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease. **Brain**, v. 141, n. 7, p. 1917-1933, 2018.

HAMPEL, H. et al. Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic. **Nat Rev Neurol**, v. 14, n. 11, p. 639-652, 2018.

HAMPTON, J. C. Effects of fixation on the morphology of Paneth cell granules. **Stain Technol**, v. 40, n. 5, p. 283-91, 1965.

HARACH, T. et al. Reduction of A β amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota. **Sci Rep**, v. 7, p. 41802, 2017.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-6, 2002.

HARTSTRA, A. V. et al. Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 38, n. 1, p. 159-65, 2015.

HEALY, G. N. et al. Objectively measured light-intensity physical activity is independently associated with 2-h plasma glucose. **Diabetes Care**, v. 30, n. 6, p. 1384-9, 2007.

HERBERT, J.; LUCASSEN, P. J. Depression as a risk factor for Alzheimer's disease: Genes, steroids, cytokines and neurogenesis - What do we need to know? **Front Neuroendocrinol**, v. 41, p. 153-71, 2016.

HEVNER, R. F. et al. Transcription factors in glutamatergic neurogenesis: conserved programs in neocortex, cerebellum, and adult hippocampus. **Neurosci Res**, v. 55, n. 3, p. 223-33, 2006.

HILLMAN, C. H.; ERICKSON, K. I.; KRAMER, A. F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 58-65, 2008.

HOJMAN, P. et al. Molecular Mechanisms Linking Exercise to Cancer Prevention and Treatment. **Cell Metab**, v. 27, p. 10-21, 2018.

HOVEYDA, N. et al. A systematic review and meta-analysis: probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. **BMC Gastroenterol**, v. 9, p. 15, 2009.

HSU, D.; MARSHALL, G. A. Primary and Secondary Prevention Trials in Alzheimer Disease: Looking Back, Moving Forward. **Curr Alzheimer Res**, v. 14, n. 4, p. 426-440, 2017.

HUANG, K.; FINGAR, D. C. Growing knowledge of the mTOR signaling network. **Semin Cell Dev Biol**, v. 36, p. 79-90, 2014.

HUANG, R.; WANG, K.; HU, J. Effect of Probiotics on Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Nutrients**, v. 8, n. 8, 2016.

HUANG, T. T. et al. Current Understanding of Gut Microbiota in Mood Disorders: An Update of Human Studies. **Front Genet**, v. 10, p. 98, 2019.

- INOUE, M. et al. Functional brain mapping of the macaque related to spatial working memory as revealed by PET. **Cereb Cortex**, v. 14, n. 1, p. 106-19, 2004.
- INOUE, Y.; SHIMOJO, N. Microbiome/microbiota and allergies. **Semin Immunopathol**, v. 37, n. 1, p. 57-64, 2015.
- JE, H. S. et al. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 39, p. 15924-9, 2012.
- JIANG, C. et al. The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, v. 58, n. 1, p. 1-15, 2017.
- JIANG, H. et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. **Brain Behav Immun**, v. 48, p. 186-94, 2015.
- JIANGUO, L. et al. Altered gut metabolome contributes to depression-like behaviors in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. **Transl Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 40, 2019.
- JINNO, S. Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse hippocampus: a stereology-based study using endogenous markers. **Hippocampus**, v. 21, n. 5, p. 467-80, 2011.
- KALUEFF, A. V. et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nat Rev Neurosci**, v. 17, n. 1, p. 45-59, 2016.
- KANG, D. W. et al. Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68322, 2013.
- KANG, E. B.; CHO, J. Y. Effect of treadmill exercise on PI3K/AKT/mTOR, autophagy, and Tau hyperphosphorylation in the cerebral cortex of NSE/htau23 transgenic mice. **J Exerc Nutrition Biochem**, v. 19, n. 3, p. 199-209, 2015.
- KANG, S. S. et al. Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition. **Mol Neurodegener**, v. 9, p. 36, 2014.

KAREGE, F. et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 9, p. 1068-72, 2005.

KATZMARZYK, P. T. et al. Sitting time and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 5, p. 998-1005, 2009.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, v. 386, n. 6624, p. 493-5, 1997.

KEMPERMANN, G.; SONG, H.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the Adult Hippocampus. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, n. 9, p. a018812, 2015.

KEMPERMANN, G.; WISKOTT, L.; GAGE, F. H. Functional significance of adult neurogenesis. **Curr Opin Neurobiol**, v. 14, n. 2, p. 186-91, 2004.

KHEIRBEK, M. A. et al. Differential control of learning and anxiety along the dorsoventral axis of the dentate gyrus. **Neuron**, v. 77, n. 5, p. 955-68, 2013.

KIELA, P. R.; GHISHAN, F. K. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 30, n. 2, p. 145-59, 2016.

KIM, B. K. et al. Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing neurogenesis in amyloid beta-induced Alzheimer disease rats. **J Exerc Rehabil**, v. 10, n. 1, p. 2-8, 2014.

KIM, J. J.; KHAN, W. I. Goblet cells and mucins: role in innate defense in enteric infections. **Pathogens**, v. 2, n. 1, p. 55-70, 2013.

KIM, J. W. et al. Comparison of Adult Hippocampal Neurogenesis and Susceptibility to Treadmill Exercise in Nine Mouse Strains. **Neural Plast**, v. 2017, p. 5863258, 2017.

KIMURA, T. et al. T-817MA, a neurotrophic agent, ameliorates the deficits in adult neurogenesis and spatial memory in rats infused i.c.v. with amyloid-beta peptide. **Br J Pharmacol**, v. 157, n. 3, p. 451-63, 2009.

KITAMURA, T. et al. Adult neurogenesis modulates the hippocampus-dependent period of associative fear memory. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 814-27, 2009.

KJELSTRUP, K. B. et al. Finite scale of spatial representation in the hippocampus. **Science**, v. 321, n. 5885, p. 140-3, 2008.

KNOPMAN, D. S. et al. Incidence of dementia among participants and nonparticipants in a longitudinal study of cognitive aging. **Am J Epidemiol**, v. 180, n. 4, p. 414-23, 2014.

KOBAYASHI, Y. et al. Therapeutic potential of Bifidobacterium breve strain A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 13510, 2017.

KOHLER, C. A. et al. The Gut-Brain Axis, Including the Microbiome, Leaky Gut and Bacterial Translocation: Mechanisms and Pathophysiological Role in Alzheimer's Disease. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 40, p. 6152-6166, 2016.

KOO, J. H. et al. Neuroprotective effects of treadmill exercise on BDNF and PI3-K/Akt signaling pathway in the cortex of transgenic mice model of Alzheimer's disease. **J Exerc Nutrition Biochem**, v. 17, n. 4, p. 151-60, 2013.

KOWALSKI, K.; MULAK, A. Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. **J Neurogastroenterol Motil**, v. 25, n. 1, p. 48-60, 2019.

KRIEGSTEIN, A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p. 149-84, 2009.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

KULMALA, J. et al. Association between mid- to late life physical fitness and dementia: evidence from the CAIDE study. **J Intern Med**, v. 276, n. 3, p. 296-307, 2014.

KWON, S. J. et al. Low-intensity treadmill exercise and/or bright light promote neurogenesis in adult rat brain. **Neural Regen Res**, v. 8, n. 10, p. 922-9, 2013.

LAMBERT, J. E. et al. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 40, n. 7, p. 749-52, 2015.

LANCOTOT, K. L. et al. Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: New treatment paradigms. **Alzheimers Dement (N Y)**, v. 3, n. 3, p. 440-449, 2017.

LANE, C. A.; HARDY, J.; SCHOTT, J. M. Alzheimer's disease. **Eur J Neurol**, v. 25, n. 1, p. 59-70, 2018.

LANE, D. J. R.; AYTON, S.; BUSH, A. I. Iron and Alzheimer's Disease: An Update on Emerging Mechanisms. **J Alzheimers Dis**, v. 64, n. s1, p. S379-S395, 2018.

LANZMASTER, D. et al. Guanosine Prevents Anhedonic-Like Behavior and Impairment in Hippocampal Glutamate Transport Following Amyloid-beta1-40 Administration in Mice. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 7, p. 5482-5496, 2016.

LAURSEN, S. E.; BELKNAP, J. K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. **J Pharmacol Methods**, v. 16, n. 4, p. 355-7, 1986.

LAZAROV, O.; MARR, R. A. Neurogenesis and Alzheimer's disease: at the crossroads. **Exp Neurol**, v. 223, n. 2, p. 267-81, 2010.

LEE, A. R. et al. Dorsal and Ventral Hippocampus Differentiate in Functional Pathways and Differentially Associate with Neurological Disease-Related Genes during Postnatal Development. **Front Mol Neurosci**, v. 10, p. 331, 2017.

LEE, I. M. et al. Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. **Lancet**, v. 380, n. 9838, p. 219-29, 2012.

LEE, T. H. et al. Treadmill exercise alleviates chronic mild stress-induced depression in rats. **J Exerc Rehabil**, v. 11, n. 6, p. 303-10, 2015.

LEHMANN, M. L. et al. Glucocorticoids orchestrate divergent effects on mood through adult neurogenesis. **J Neurosci**, v. 33, n. 7, p. 2961-72, 2013.

LEVER, C.; BURTON, S.; O'KEEFE, J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. **Rev Neurosci**, v. 17, n. 1-2, p. 111-33, 2006.

LIANG, S. et al. Recognizing Depression from the Microbiota(-)Gut(-)Brain Axis. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 6, 2018.

LIE, D. C. et al. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 399-421, 2004.

LIN, N. et al. Injection of Abeta1-40 into hippocampus induced cognitive lesion associated with neuronal apoptosis and multiple gene expressions in the tree shrew. **Apoptosis**, v. 21, n. 5, p. 621-40, 2016.

LIU, H. et al. Osthole Upregulates BDNF to Enhance Adult Hippocampal Neurogenesis in APP/PS1 Transgenic Mice. **Biol Pharm Bull**, v. 38, n. 10, p. 1439-49, 2015.

LIU, P. Z.; NUSSLOCK, R. Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. **Front Neurosci**, v. 12, p. 52, 2018a.

LIU, P.Z., NUSSLOCK, R., How Stress Gets Under the Skin: Early Life Adversity and Glucocorticoid Receptor Epigenetic Regulation. *Curr Genomics*, v. 19, n. 8, p. 653-664, 2018b.

LIU, T. W. et al. Physical Activity Differentially Affects the Cecal Microbiota of Ovariectomized Female Rats Selectively Bred for High and Low Aerobic Capacity. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136150, 2015.

LIU, X.; CAO, S.; ZHANG, X. Modulation of Gut Microbiota-Brain Axis by Probiotics, Prebiotics, and Diet. **J Agric Food Chem**, v. 63, n. 36, p. 7885-95, 2015.

LIU, Y. F. et al. Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. **J Physiol**, v. 587, n. Pt 13, p. 3221-31, 2009.

LIU, Y. The beneficial effects of physical exercise in the brain and related pathophysiological mechanisms in neurodegenerative diseases. **Lab Invest**, v. 99, p. 943-957, 2019.

LLOYD, B. A. et al. Exercise increases mTOR signaling in brain regions involved in cognition and emotional behavior. **Behav Brain Res**, v. 323, p. 56-67, 2017.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LOZUPONE, C. A. et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 220-30, 2012.

LU, C. et al. Kai Xin San aqueous extract improves A β 1-40-induced cognitive deficits on adaptive behavior learning by enhancing memory-related molecules expression in the hippocampus. **J Ethnopharmacol**, v. 201, p. 73-81, 2017.

LUCZYNSKI, P. et al. Adult microbiota-deficient mice have distinct dendritic morphological changes: differential effects in the amygdala and hippocampus. **Eur J Neurosci**, v. 44, n. 9, p. 2654-2666, 2016.

- LUDKA, F. K. et al. Atorvastatin Protects from Abeta1-40-Induced Cell Damage and Depressive-Like Behavior via ProBDNF Cleavage. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 8, p. 6163-6173, 2017.
- LUO, B. et al. The effects of moderate exercise on chronic stress-induced intestinal barrier dysfunction and antimicrobial defense. **Brain Behav Immun**, v. 39, p. 99-106, 2014.
- LUO, L. et al. Effect of aerobic exercise on BDNF/proBDNF expression in the ischemic hippocampus and depression recovery of rats after stroke. **Behav Brain Res**, v. 362, p. 323-331, 2019.
- LURIE, I. et al. Antibiotic exposure and the risk for depression, anxiety, or psychosis: a nested case-control study. **J Clin Psychiatry**, v. 76, n. 11, p. 1522-8, 2015.
- LYTE, M. et al. Induction of anxiety-like behavior in mice during the initial stages of infection with the agent of murine colonic hyperplasia *Citrobacter rodentium*. **Physiol Behav**, v. 89, n. 3, p. 350-7, 2006.
- MA, X. et al. Impact of treadmill running and sex on hippocampal neurogenesis in the mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e36048, 2012.
- MAEKAWA, T. et al. Electrically evoked local muscle contractions cause an increase in hippocampal BDNF. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 43, n. 5, p. 491-496, 2018.
- MAGNUSON, B.; EKIM, B.; FINGAR, D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. **Biochem J**, v. 441, n. 1, p. 1-21, 2012.
- MAGUIRE, E. A. et al. Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 8, p. 4398-403, 2000.
- MAGUIRE, E. A. et al. Navigation expertise and the human hippocampus: a structural brain imaging analysis. **Hippocampus**, v. 13, n. 2, p. 250-9, 2003.
- MAHAR, I. et al. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 38, p. 173-92, 2014.

- MALISZEWSKA-CYNA, E.; XHIMA, K.; AUBERT, I. A Comparative Study Evaluating the Impact of Physical Exercise on Disease Progression in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, v. 53, n. 1, p. 243-57, 2016.
- MALKESMAN, O. et al. The female urine sniffing test: a novel approach for assessing reward-seeking behavior in rodents. **Biol Psychiatry**, v. 67, n. 9, p. 864-71, 2010.
- MARLATT, M. W. et al. Prolonged running, not fluoxetine treatment, increases neurogenesis, but does not alter neuropathology, in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease. **Curr Top Behav Neurosci**, v. 15, p. 313-40, 2013.
- MASTERS, M. C.; MORRIS, J. C.; ROE, C. M. "Noncognitive" symptoms of early Alzheimer disease: a longitudinal analysis. **Neurology**, v. 84, n. 6, p. 617-22, 2015.
- MATURA, S. et al. Physical Exercise for the Treatment of Neuropsychiatric Disturbances in Alzheimer's Dementia: Possible Mechanisms, Current Evidence and Future Directions. **Curr Alzheimer Res**, v. 13, n. 10, p. 1112-23, 2016.
- MCVEY NEUFELD, K. A.; KAY, S.; BIENENSTOCK, J. Mouse Strain Affects Behavioral and Neuroendocrine Stress Responses Following Administration of Probiotic Lactobacillus rhamnosus JB-1 or Traditional Antidepressant Fluoxetine. **Front Neurosci**, v. 12, p. 294, 2018.
- MEDBO, J. I. et al. Anaerobic capacity determined by maximal accumulated O₂ deficit. **J Appl Physiol (1985)**, v. 64, n. 1, p. 50-60, 1988.
- MENKE, A. Is the HPA Axis as Target for Depression Outdated, or Is There a New Hope? **Front Psychiatry**, v. 10, p. 101, 2019.
- MERKLE, F. T. et al. Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 2, p. 207-14, 2014.
- MIELKE, G. I. et al. Brazilian adults' sedentary behaviors by life domain: population-based study. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e91614, 2014.
- MIGLIORELLI, R. et al. Anosognosia in Alzheimer's disease: a study of associated factors. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**, v. 7, n. 3, p. 338-44, 1995.

MIKA, A. et al. Exercise is More Effective at Altering Gut Microbial Composition and Producing Stable Changes in Lean Mass in Juvenile versus Adult Male F344 Rats. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125889, 2015.

MOHAJERI, M. H. Brain Aging and Gut(-)Brain Axis. **Nutrients**, v. 11, n. 2, 2019.

MOHLE, L. et al. Ly6C Monocytes Provide a Link between Antibiotic-Induced Changes in Gut Microbiota and Adult Hippocampal Neurogenesis. **Cell Rep**, v. 15, n. 9, p. 1945-56, 2016.

MOKHTARZADE, M. et al. Exercise-induced changes in neurotrophic factors and markers of blood-brain barrier permeability are moderated by weight status in multiple sclerosis. **Neuropeptides**, v. 70, p. 93-100, 2018.

MONDA, V. et al. Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, p. 3831972, 2017.

MOREIRA, E. L. et al. Age-related cognitive decline in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice (LDLr^{-/-}): evidence of antioxidant imbalance and increased acetylcholinesterase activity in the prefrontal cortex. **J Alzheimers Dis**, v. 32, n. 2, p. 495-511, 2012.

MORENO-JIMENEZ, E. P. et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. **Nat Med**, v. 25, n. 4, p. 554-560, 2019.

MORETTI, M. et al. Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. **J Mol Neurosci**, v. 49, n. 1, p. 68-79, 2013.

MORRIS, J. K. et al. Aerobic exercise for Alzheimer's disease: A randomized controlled pilot trial. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0170547, 2017.

MOSER, E.; MOSER, M. B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **J Neurosci**, v. 13, n. 9, p. 3916-25, 1993.

MURAI, T. et al. Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies. **Physiol Behav**, v. 90, n. 1, p. 116-24, 2007.

MURATA, Y. et al. Prolonged sleep deprivation decreases cell proliferation and immature newborn neurons in both dorsal and ventral hippocampus of male rats. **Neurosci Res**, v. 131, p. 45-51, 2018.

NG, T. K. S. et al. Decreased Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Patients with Alzheimer's Disease (AD): A Systematic Review and Meta-Analysis. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 2, 2019.

NOVAIS, F.; STARKSTEIN, S. Phenomenology of Depression in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**, v. 47, n. 4, p. 845-55, 2015.

O'LEARY, O. F. et al. The vagus nerve modulates BDNF expression and neurogenesis in the hippocampus. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 28, n. 2, p. 307-316, 2018.

O'SULLIVAN, O. et al. Exercise and the microbiota. **Gut Microbes**, v. 6, n. 2, p. 131-6, 2015.

OGBONNAYA, E. S. et al. Adult Hippocampal Neurogenesis Is Regulated by the Microbiome. **Biol Psychiatry**, v. 78, n. 4, p. e7-9, 2015.

OLSON, A. K. et al. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 250-60, 2006.

OOMEN, C. A. et al. Adult hippocampal neurogenesis and its role in cognition. **Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci**, v. 5, n. 5, p. 573-587, 2014.

OTT, A. et al. Incidence and risk of dementia. The Rotterdam Study. **Am J Epidemiol**, v. 147, n. 6, p. 574-80, 1998.

OUELLETTE, A. J. Paneth cell alpha-defensin synthesis and function. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 306, p. 1-25, 2006.

PADILLA-COREANO, N. et al. Direct Ventral Hippocampal-Prefrontal Input Is Required for Anxiety-Related Neural Activity and Behavior. **Neuron**, v. 89, n. 4, p. 857-66, 2016.

PAILLARD, T.; ROLLAND, Y.; DE SOUTO BARRETO, P. Protective Effects of Physical Exercise in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Narrative Review. **J Clin Neurol**, v. 11, n. 3, p. 212-9, 2015.

PALOP, J. J.; MUCKE, L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 812-8, 2010.

PAMPLONA, F. A. et al. Altered emotionality leads to increased pain tolerance in amyloid beta (Abeta1-40) peptide-treated mice. **Behav Brain Res**, v. 212, n. 1, p. 96-102, 2010.

PAN, W. et al. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 12, p. 1553-61, 1998.

PANG, P. T.; LU, B. Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. **Ageing Res Rev**, v. 3, n. 4, p. 407-30, 2004.

PANG, T. Y. et al. Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. **Neuroscience**, v. 141, n. 2, p. 569-84, Aug 25 2006.

PAPATHEODOROPOULOS, C. Electrophysiological evidence for long-axis intrinsic diversification of the hippocampus. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 23, p. 109-145, 2018.

PASSOS, G. F. et al. Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by beta-amyloid 1-40 peptide in mice. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 3, p. 493-501, 2010.

PATEL, H. et al. Aerobic vs anaerobic exercise training effects on the cardiovascular system. **World J Cardiol**, v. 9, n. 2, p. 134-138, 2017.

PATKI, G. et al. Tempol treatment reduces anxiety-like behaviors induced by multiple anxiogenic drugs in rats. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0117498, 2015.

PAZINI, F. L. et al. Creatine, Similar to Ketamine, Counteracts Depressive-Like Behavior Induced by Corticosterone via PI3K/Akt/mTOR Pathway. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 10, p. 6818-6834, 2016.

PAZINI, F. L. et al. Creatine Prevents Corticosterone-Induced Reduction in Hippocampal Proliferation and Differentiation: Possible Implication for Its Antidepressant Effect. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 8, p. 6245-6260, 2017.

PEI, J. J.; HUGON, J. mTOR-dependent signalling in Alzheimer's disease. **J Cell Mol Med**, v. 12, n. 6B, p. 2525-32, 2008.

PENNISI, E. Gut bacteria linked to mental well-being and depression. **Science**, v. 363, n. 6427, p. 569, 2019.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 3, p. 141-53, 2014.

PETRIZ, B. A. et al. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. **BMC Genomics**, v. 15, p. 511, 2014.

PLATENIK, J. et al. GSK3beta, CREB, and BDNF in peripheral blood of patients with Alzheimer's disease and depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 50, p. 83-93, 2014.

PORSOLT, R. D.; LE PICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730-2, 1977.

PREDIGER, R. D. et al. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav Brain Res**, v. 177, n. 2, p. 205-13, 2007.

PRINCE, M. et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. **Alzheimers Dement**, v. 9, n. 1, p. 63-75 e2, 2013.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

QIU, G.; WU, X. Q.; LUO, X. G. [Effect of polygonum multiflorum thunb on BDNF expression in rat hippocampus induced by amyloid beta-protein (Abeta) 1-40]. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 31, n. 2, p. 194-9, 2006.

QUIGLEY, E. M. M. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 17, n. 12, p. 94, 2017.

REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 3, p. 137-52, 2011.

- RIBA, A. et al. Paneth Cell Defects Induce Microbiota Dysbiosis in Mice and Promote Visceral Hypersensitivity. **Gastroenterology**, v. 153, n. 6, p. 1594-1606 e2, 2017.
- RINNINELLA, E. et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, 2019.
- ROBERTS, R. O. et al. The incidence of MCI differs by subtype and is higher in men: the Mayo Clinic Study of Aging. **Neurology**, v. 78, n. 5, p. 342-51, 2012.
- RODRIGUES, A. L. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci**, v. 70, n. 12, p. 1347-58, 2002.
- ROSA, E.; FAHNESTOCK, M. CREB expression mediates amyloid beta-induced basal BDNF downregulation. **Neurobiol Aging**, v. 36, n. 8, p. 2406-13, 2015.
- ROSA, J. M. et al. Antidepressant effects of creatine on amyloid beta1-40-treated mice: The role of GSK-3beta/Nrf2 pathway. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 86, p. 270-278, 2018.
- ROSA, J. M. et al. Prophylactic effect of physical exercise on Abeta1-40-induced depressive-like behavior: Role of BDNF, mTOR signaling, cell proliferation and survival in the hippocampus. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 94, p. 109646, 2019.
- ROWLAND, I. et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. **Eur J Nutr**, v. 57, n. 1, p. 1-24, 2018.
- SAKONO, M.; ZAKO, T. Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. **FEBS J**, v. 277, n. 6, p. 1348-58, 2010.
- SALOMONE, S. et al. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. **Br J Clin Pharmacol**, v. 73, n. 4, p. 504-17, 2012.
- SANTOS, V. V. et al. Acyl ghrelin improves cognition, synaptic plasticity deficits and neuroinflammation following amyloid beta (Abeta1-40) administration in mice. **J Neuroendocrinol**, v. 29, n. 5, 2017.

- SARAULLI, D. et al. The Long Run: Neuroprotective Effects of Physical Exercise on Adult Neurogenesis from Youth to Old Age. **Curr Neuropharmacol**, v. 15, n. 4, p. 519-533, 2017.
- SATOH, Y. et al. Ultrastructure of Paneth cells in the intestine of various mammals. **J Electron Microscop Tech**, v. 16, n. 1, p. 69-80, 1990.
- SAVIGNAC, H. M. et al. Prebiotic feeding elevates central brain derived neurotrophic factor, N-methyl-D-aspartate receptor subunits and D-serine. **Neurochem Int**, v. 63, n. 8, p. 756-64, 2013.
- SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. **Behav Pharmacol**, v. 18, n. 5-6, p. 391-418, 2007.
- SCHNEIDER, L. S. Alzheimer disease pharmacologic treatment and treatment research. **Continuum (Minneapolis Minn)**, v. 19, n. 2 Dementia, p. 339-57, 2013.
- SCHUCH, F. et al. Physical activity and sedentary behavior in people with major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. **J Affect Disord**, v. 210, p. 139-150, 2017.
- SCORZA, F. A. et al. Neurogenesis and depression: etiology or new illusion?. **Braz J Psychiatry**, v. 27, n. 3, p. 249-53, 2005.
- SCOTT, L. V.; CLARKE, G.; DINAN, T. G. The brain-gut axis: a target for treating stress-related disorders. **Mod Trends Pharmacopsychiatry**, v. 28, p. 90-9, 2013.
- SCRIVEN, M. et al. Neuropsychiatric Disorders: Influence of Gut Microbe to Brain Signalling. **Diseases**, v. 6, n. 3, 2018.
- SELKOE, D. J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO Mol Med**, v. 8, n. 6, p. 595-608, 2016.
- SEN, S.; DUMAN, R.; SANACORA, G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. **Biol Psychiatry**, v. 64, n. 6, p. 527-32, 2008.
- SEO, J. H. Treadmill exercise alleviates stress-induced anxiety-like behaviors in rats. **J Exerc Rehabil**, v. 14, n. 5, p. 724-730, 2018.

SERRA, D.; ALMEIDA, L. M.; DINIS, T. C. P. The Impact of Chronic Intestinal Inflammation on Brain Disorders: the Microbiota-Gut-Brain Axis. **Mol Neurobiol**, v. 56, n. 10, p. 6941-6951, 2019.

SHACKMAN, A. J. et al. Neural mechanisms underlying heterogeneity in the presentation of anxious temperament. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 15, p. 6145-50, 2013.

SHARON, G. et al. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. **Cell**, v. 167, n. 4, p. 915-932, 2016.

SHIN, M. S. et al. Treadmill exercise improves depression-like symptoms by enhancing serotonergic function through upregulation of 5-HT1A expression in the olfactory bulbectomized rats. **J Exerc Rehabil**, v. 13, n. 1, p. 36-42, 2017.

SLEIMAN, S. F. et al. Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) through the action of the ketone body beta-hydroxybutyrate. **Elife**, v. 5, 2016.

SLYEPCHENKO, A. et al. Gut emotions - mechanisms of action of probiotics as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 13, n. 10, p. 1770-86, 2014.

SLYKERMAN, R. F. et al. Effect of Lactobacillus rhamnosus HN001 in Pregnancy on Postpartum Symptoms of Depression and Anxiety: A Randomised Double-blind Placebo-controlled Trial. **EBioMedicine**, v. 24, p. 159-165, 2017.

SNYDER, H. M. et al. Sex biology contributions to vulnerability to Alzheimer's disease: A think tank convened by the Women's Alzheimer's Research Initiative. **Alzheimers Dement**, v. 12, n. 11, p. 1186-1196, 2016.

SOFI, F. et al. Physical activity and risk of cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. **J Intern Med**, v. 269, n. 1, p. 107-17, 2011.

SONG, J. et al. Neuronal Circuitry Mechanisms Regulating Adult Mammalian Neurogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 8, n. 8, 2016.

SORBI, S. et al. Genetic risk factors in familial Alzheimer's disease. **Mech Ageing Dev**, v. 122, n. 16, p. 1951-60, 2001.

SPILLER, R.; HOAD, C. Enhancing our understanding of small bowel function using modern imaging techniques. **Neurogastroenterol Motil**, p. e13616, 2019.

STANTON, R.; REABURN, P. Exercise and the treatment of depression: a review of the exercise program variables. **J Sci Med Sport**, v. 17, n. 2, p. 177-82, 2014.

STARKSTEIN, S. E. et al. Diagnostic criteria for depression in Alzheimer disease: a study of symptom patterns using latent class analysis. **Am J Geriatr Psychiatry**, v. 19, n. 6, p. 551-8, 2011.

STEENBERGEN, L. et al. A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. **Brain Behav Immun**, v. 48, p. 258-64, 2015.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 85, n. 3, p. 367-70, 1985.

STILLING, R. M. et al. The neuropharmacology of butyrate: The bread and butter of the microbiota-gut-brain axis? **Neurochem Int**, v. 99, p. 110-132, 2016.

STRANGE, B. A. et al. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nat Rev Neurosci**, v. 15, n. 10, p. 655-69, 2014.

STUBBS, B. et al. Relationship between sedentary behavior and depression: A mediation analysis of influential factors across the lifespan among 42,469 people in low- and middle-income countries. **J Affect Disord**, v. 229, p. 231-238, 2018.

SU, D. et al. Vitamin D Signaling through Induction of Paneth Cell Defensins Maintains Gut Microbiota and Improves Metabolic Disorders and Hepatic Steatosis in Animal Models. **Front Physiol**, v. 7, p. 498, 2016.

SUN, J. et al. Clostridium butyricum Attenuates Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depressive-Like Behavior in Mice via the Gut-Brain Axis. **J Agric Food Chem**, v. 66, n. 31, p. 8415-8421, 2018.

SUN, Y. X. et al. Differential activation of mTOR complex 1 signaling in human brain with mild to severe Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 38, n. 2, p. 437-44, 2014.

SUNG, Y. H. Effects of treadmill exercise on hippocampal neurogenesis in an MPTP/probenecid-induced Parkinson's disease mouse model. **J Phys Ther Sci**, v. 27, n. 10, p. 3203-6, 2015.

SVENSSON, M.; LEXELL, J.; DEIERBORG, T. Effects of Physical Exercise on Neuroinflammation, Neuroplasticity, Neurodegeneration, and Behavior: What We Can Learn From Animal Models in Clinical Settings. **Neurorehabil Neural Repair**, v. 29, n. 6, p. 577-89, 2015.

SWAAB, D. F.; BAO, A. M.; LUCASSEN, P. J. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing Res Rev**, v. 4, n. 2, p. 141-94, 2005.

TAKEI, N.; NAWA, H. mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. **Front Mol Neurosci**, v. 7, p. 28, 2014.

TANG, W. H.; HAZEN, S. L. The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. **J Clin Invest**, v. 124, n. 10, p. 4204-11, 2014.

TANTI, A. et al. Region-dependent and stage-specific effects of stress, environmental enrichment, and antidepressant treatment on hippocampal neurogenesis. **Hippocampus**, v. 23, n. 9, p. 797-811, 2013.

TANZI, R. E.; BERTRAM, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 545-55, 2005.

TARI, A. R. et al. Are the neuroprotective effects of exercise training systemically mediated? **Prog Cardiovasc Dis**, v. 62, n. 2, p. 94-101, 2019.

TEN BRINKE, L. F. et al. Aerobic exercise increases hippocampal volume in older women with probable mild cognitive impairment: a 6-month randomised controlled trial. **Br J Sports Med**, v. 49, n. 4, p. 248-54, 2015.

TENG, E. et al. Diagnosing depression in Alzheimer disease with the national institute of mental health provisional criteria. **Am J Geriatr Psychiatry**, v. 16, n. 6, p. 469-77, 2008.

THIEL, C. M. et al. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. **Neuroscience**, v. 93, n. 1, p. 243-51, 1999.

TODA, T. et al. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. **Mol Psychiatry**, v. 24, n. 1, p. 67-87, 2019.

TRABER, P. G. et al. Sucrase-isomaltase gene expression along crypt-villus axis of human small intestine is regulated at level of mRNA abundance. **Am J Physiol**, v. 262, n. 1 Pt 1, p. G123-30, 1992.

TREVISAN, K. et al. Theories of Aging and the Prevalence of Alzheimer's Disease. **Biomed Res Int**, v. 2019, p. 9171424, 2019.

TROUGHTON, W. D.; TRIER, J. S. Paneth and goblet cell renewal in mouse duodenal crypts. **J Cell Biol**, v. 41, n. 1, p. 251-68, 1969.

UINT, L. et al. Increased levels of plasma IL-1b and BDNF can predict resistant depression patients. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, v. 65, n. 3, p. 361-369, 2019.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 23, p. 13427-31, 1999.

VAN PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. **Neuromolecular Med**, v. 10, n. 2, p. 128-40, 2008.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v. 2, n. 3, p. 266-70, 1999.

VAN PRAAG, H. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1030-4, 2002.

VICTORINO, A. B. et al. Aerobic exercise in adolescence results in an increase of neuronal and non-neuronal cells and in mTOR overexpression in the cerebral cortex of rats. **Neuroscience**, v. 361, p. 108-115, 2017.

VOGT, N. M. et al. Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 13537, 2017.

VOLK, N.; LACY, B. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. **Gastrointest Endosc Clin N Am**, v. 27, n. 1, p. 1-13, 2017.

VOLLERT, C. et al. Exercise prevents sleep deprivation-associated anxiety-like behavior in rats: potential role of oxidative stress mechanisms. **Behav Brain Res**, v. 224, n. 2, p. 233-40, 2011.

WALLACE, C. J. K. et al. The Effects of Probiotics on Symptoms of Depression: Protocol for a Double-Blind Randomized Placebo-Controlled Trial. **Neuropsychobiology**, p. 1-9, 2019.

WALSH, J. J. et al. Changes in the Brain-Derived Neurotrophic Factor Are Associated with Improvements in Diabetes Risk Factors after Exercise Training in Adolescents with Obesity: The HEARTY Randomized Controlled Trial. **Neural Plast**, v. 2018, p. 7169583, 2018.

WALSH, J. J.; TSCHAKOVSKY, M. E. Exercise and circulating BDNF: Mechanisms of release and implications for the design of exercise interventions. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 43, n. 11, p. 1095-1104, 2018.

WANG, H. X.; WANG, Y. P. Gut Microbiota-brain Axis. **Chin Med J (Engl)**, v. 129, n. 19, p. 2373-80, 2016.

WANG, Y.; KASPER, L. H. The role of microbiome in central nervous system disorders. **Brain Behav Immun**, v. 38, p. 1-12, 2014.

WANG, R., REDDY, P.H. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis**. p. 1041-1048, 2017.

WATSON, K.; BAAR, K. mTOR and the health benefits of exercise. **Semin Cell Dev Biol**, v. 36, p. 130-9, 2014.

WELLY, R. J. et al. Comparison of Diet versus Exercise on Metabolic Function and Gut Microbiota in Obese Rats. **Med Sci Sports Exerc**, v. 48, n. 9, p. 1688-98, 2016.

WHEELER, M. J. et al. Sedentary behavior as a risk factor for cognitive decline? A focus on the influence of glycemic control in brain health. **Alzheimers Dement (N Y)**, v. 3, n. 3, p. 291-300, 2017.

WHITE, L. J.; CASTELLANO, V. Exercise and brain health--implications for multiple sclerosis: Part 1--neuronal growth factors. **Sports Med**, v. 38, n. 2, p. 91-100, 2008.

WINER, E. S.; JORDAN, D. G.; COLLINS, A. C. Conceptualizing anhedonias and implications for depression treatments. **Psychol Res Behav Manag**, v. 12, p. 325-335, 2019.

WINTER, Y. et al. Depression in elderly patients with Alzheimer dementia or vascular dementia and its influence on their quality of life. **J Neurosci Rural Pract**, v. 2, n. 1, p. 27-32, 2011.

WRANN, C. D. et al. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1alpha/FNDC5 pathway. **Cell Metab**, v. 18, n. 5, p. 649-59, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global recommendations on physical activity for health. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Bulletin of the World Health Organization. p 390-390, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The global action plan on physical activity 2018 – 2030, 2018.

WU, M. V. et al. Impact of social status and antidepressant treatment on neurogenesis in the baboon hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 8, p. 1861-71, 2014.

WU, Y. P. et al. Predator stress-induced depression is associated with inhibition of hippocampal neurogenesis in adult male mice. **Neural Regen Res**, v. 14, n. 2, p. 298-305, 2019.

XIONG, B. et al. Precise Cerebral Vascular Atlas in Stereotaxic Coordinates of Whole Mouse Brain. **Front Neuroanat**, v. 11, p. 128, 2017.

YOUSSEF, M. M. et al. Association of BDNF Val66Met Polymorphism and Brain BDNF Levels with Major Depression and Suicide. **Int J Neuropsychopharmacol**, v. 21, n. 6, p. 528-538, 2018.

YU, F. et al. Effects of aerobic exercise on cognition and hippocampal volume in Alzheimer's disease: study protocol of a randomized controlled trial (The FIT-AD trial). **Trials**, v. 15, p. 394, 2014.

YU, T. et al. Dynamic Expression and the Role of BDNF in Exercise-induced Skeletal Muscle Regeneration. **Int J Sports Med**, v. 38, n. 13, p. 959-966, 2017.

- YU, T. et al. Association of Bactericidal Dysfunction of Paneth Cells in Streptozocin-Induced Diabetic Mice with Insulin Deficiency. **Med Sci Monit**, v. 22, p. 3062-72, 2016.
- ZHAI, L.; ZHANG, Y.; ZHANG, D. Sedentary behaviour and the risk of depression: a meta-analysis. **Br J Sports Med**, v. 49, n. 11, p. 705-9, 2015.
- ZHANG, H. et al. Host adaptive immunity alters gut microbiota. **ISME J**, v. 9, n. 3, p. 770-81, 2015.
- ZHAO, Q. F. et al. The prevalence of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis. **J Affect Disord**, v. 190, p. 264-271, 2016.
- ZHONG, F. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Precursor in the Hippocampus Regulates Both Depressive and Anxiety-Like Behaviors in Rats. **Front Psychiatry**, v. 9, p. 776, 2018.
- ZHONG, P. et al. Monoacylglycerol lipase inhibition blocks chronic stress-induced depressive-like behaviors via activation of mTOR signaling. **Neuropsychopharmacology**, v. 39, n. 7, p. 1763-76, 2014.
- ZIGOVA, T. et al. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. **Mol Cell Neurosci**, v. 11, n. 4, p. 234-45, 1998.