

Aline Siteneski

**EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA IRISINA E SEU  
POSSÍVEL PAPEL PRÓ-NEUROGÊNICO APÓS EXERCÍCIOS  
FÍSICOS EM CAMUNDONGOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia Severo Rodrigues

Coorientador: Dr. Mauricio Peña Cunha

Florianópolis  
2019

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

Siteneski, Aline

EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA IRISINA E SEU  
POSSÍVEL PAPEL PRÓ-NEUROGÊNICO APÓS EXERCÍCIOS  
FÍSICOS EM CAMUNDONGOS / Aline Siteneski ;  
orientadora, Ana Lúcia Severo Rodrigues,  
coorientador, Maurício Peña Cunha, 2019.

142 p.

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

Inclui referências.

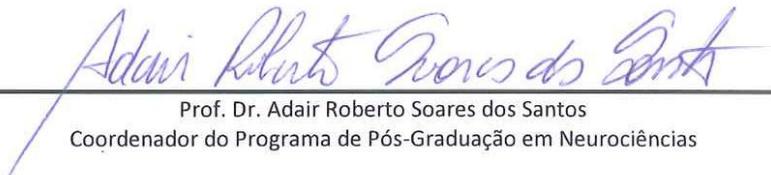
1. Neurociências. 2. Efeito tipo-antidepressivo.  
3. Neurogênese . 4. Irisina. 5. Exercício físico. I.  
Severo Rodrigues, Ana Lúcia . II. Peña Cunha,  
Maurício. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.  
IV. Título.

**“Efeito tipo-antidepressivo da irisina e seu possível papel pró-neurogênico após exercícios físicos em camundongos”**

Por

**Aline Siteneski**

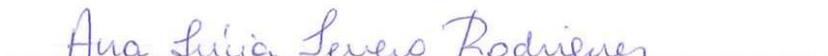
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (009/2019/PGN) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências - UFSC.



---

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Banca examinadora:



---

Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



---

Dra. Juliana Ben (Universidade do Estado de Santa Catarina)



---

Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr. Rui Daniel Schröder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 27 de março de 2019.



*Com amor, à minha filha Djenyfer,  
minha mãe Horandina e meu marido  
Felipe.*



## AGRADECIMENTOS

A verdadeira felicidade está em aprender, e neste caminho tive a alegria de contar com pessoas muito especiais as quais sou imensamente grata.

Agradeço à minha família. Minha mãe Horandina pelo amor incondicional, por dedicar seu tempo a mim, pelo apoio, paciência e carinho durante todo este tempo. Aos meus irmãos Darlan e Robin que mesmo distante estão sempre próximos por me incentivar e acreditar em mim. Ao meu pai Dair pelo apoio nos estudos.

Sou eternamente grata a Deus por ter me dado você minha filha Djenyfer, este momento jamais aconteceria se não fosse por você. Obrigada por cada sorriso, por todo amor, pelo carinho e apoio nos tempos difíceis, a vida não teria graça sem você.

Ao meu amor da minha vida Felipe, obrigada por estar ao meu lado, por cada palavra de incentivo e força, por acreditar em mim sem jamais duvidar da minha capacidade, por me dizer “tranquila amor”, por se sacrificar junto comigo por tudo isso, você também é responsável por esta felicidade que sinto.

A minha Professora Ana Lúcia, pela generosidade, tolerância, compaixão e bondade com minha falta de compreensão das coisas. Obrigada pela paciência com meus textos, e pelos ensinamentos diários. Agradeço a Deus por ter tido o privilégio de tê-la como orientadora.

Ao meu coorientador Mauricio meu respeito e admiração, obrigada por me permitir compartilhar o projeto com a irisina, essa molécula apaixonante. Pela paciência e pelos ensinamentos nos experimentos e correções de texto.

Aos colegas e amigos do LANED. Especialmente ao Francis, você foi essencial não apenas pelos cafés e papos, mas pela ajuda nos experimentos e principalmente pela paciência com as correções dos meus textos, tudo fica perfeito depois de passar por tuas mãos, obrigada. A Júlia minha companheira de “*exercise*” e ao Anderson o “*blotting boy*” eficiência é teu nome, obrigada pelos muitos cafés por me escutarem, vocês tornaram minha caminhada mais leve. Aos demais colegas do laboratório vocês todos colaboraram com minha formação eu

aprendi muito com vocês: Karen, Luis, Ana Ramos, Morgana, Vivian e Priscila.

A minha amiga Renata, minha terapeuta, sem você na minha vida eu não chegaria aqui com lucidez mental, obrigada por me escutar, apoiar e me trazer para a realidade. A você todo meu amor, gratidão e admiração, sei que você se alegra por mim, quero que saiba que você é parte essencial de tudo isso. A minha amiga Gislaine, pelo apoio, por me escutar me auxiliar nos experimentos, pelas praias, comprinhas e correções de textos. A minha amiga Daiane, meu exemplo de disciplina, competência e carinho. Meninas, obrigada por não me deixar experimentar a solidão e por caminharem comigo em busca da evolução espiritual e intelectual, vocês sempre poderão contar comigo.

Agradeço a todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender. Em especial a professora Patrícia Brocardo e a professora Joana Gil-Mohapel, por auxiliarem na técnica de imuno-histoquímica e pelas correções do *paper*. Pelo exemplo de simplicidade, e humildade, admiro muito o trabalho de vocês obrigada por compartilharem seus conhecimentos.

Obrigada aos colegas do LANEP, Cristhine, Eveline e Cláudia pelo carinho, conversas, cafés, ajuda nos trabalhos e pelos melhores brigadeiros e bolo de cérebro, vocês tornaram meu dia mais especial.

Aos colegas de disciplinas, pelo conhecimento compartilhado.

Aos técnicos do LAMEB, em especial a Chirle e Emili e Laise pelos cafezinhos agradáveis, por não medir esforços para auxiliar nos experimentos.

A secretaria do PPG de Neurociências, em especial ao Nivaldo, pela ajuda com todas as burocracias.

A CAPES pelo apoio financeiro no doutorado e ao PPG em Neurociências da UFSC.

Aos animais experimentais utilizados neste trabalho, minha gratidão e respeito.

“O conhecimento não é um meio para atingir um fim, ele só vai ser seu quando for o fim em si mesmo.”

(Anete Guimarães, 2015)

“Human evolution might have found very efficient ways to balance proliferation and the duration of the critical maturation period in order to provide the level of hippocampal plasticity that the individual requires.”

(Kempermann, 2018)



## RESUMO

A depressão é um dos transtornos psiquiátricos mais prevalentes na sociedade e está associada com múltiplas causas fisiopatológicas, tais como alterações nos níveis de neurotransmissores e a redução na biodisponibilidade de fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Estes eventos levam a alterações morfofuncionais no hipocampo e córtex pré-frontal afetando assim a neuroplasticidade como um todo, em especial a neurogênese hipocampal adulta. O exercício físico é uma estratégia não farmacológica que pode ser utilizada como alternativa e/ou concomitante ao tratamento com fármacos antidepressivos, uma vez que é capaz de produzir efeito antidepressivo e pró-neurogênico. Após protocolos de exercício físico, o músculo é capaz de produzir uma miocina denominada irisina. A irisina tem origem a partir da proteína transmembrana fibronectina tipo III contendo o domínio 5 (FNDC5), que após clivagem e glicosilação é liberada para o meio extracelular possuindo efeito em órgãos distantes como o cérebro. Assim, com o objetivo de explorar o potencial tipo-antidepressivo da irisina *per se* e após protocolos de exercícios físicos, esta Tese está apresentada em dois Capítulos. O primeiro Capítulo teve o intuito de elucidar os mecanismos celulares e moleculares pelos quais a irisina e o BDNF apresentam efeito tipo- antidepressivo, enquanto que o Capítulo 2 avaliou o efeito da irisina produzida endogenamente após um protocolo de exercício físico aeróbio de *endurance*, sobre parâmetros de neuroplasticidade, como etapas da neurogênese hipocampal adulta. Os resultados do Capítulo I mostram uma redução do tempo de imobilidade no TSC e no TNF em camundongos C57BL/6 machos após o tratamento com irisina (0,5 e 1 ng/camundongo, i.c.v.) e uma redução do tempo de imobilidade no TSC após a administração de BDNF (0,25 µg/camundongo, i.c.v.), um efeito que foi sustentado por até 6 horas após uma única administração de irisina (1 ng/camundongo, i.c.v.) e BDNF (0,25 µg/camundongo). Além disso, nenhuma alteração locomotora foi observada no TCA com a administração de irisina, enquanto que o BDNF reduziu o número de quadrantes cruzados. A irisina promoveu um efeito tipo-antidepressivo semelhante ao BDNF e ambos estão associados a modulação dos genes PGC1- $\alpha$ , FNDC5 e BDNF tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo dos camundongos. Assim nossos dados reforçam a importância da via de sinalização PGC1 $\alpha$ /FNDC5/BDNF na depressão. No segundo Capítulo, os experimentos foram realizados com camundongos *Swiss* fêmeas submetidos a um protocolo de treinamento aeróbio de *endurance* de

quatro semanas em uma esteira de corrida. Após o protocolo, verificamos uma redução na imobilidade no TSC e TNF e este efeito tipo-antidepressivo foi acompanhado de um aumento da proliferação celular, diferenciação neuronal e sobrevivência de células hipocampais dos camundongos. Cabe ressaltar que este efeito pró-neurogênico foi verificado tanto no giro denteado (GD) ventral e dorsal do hipocampo. Além disso, este protocolo de exercício físico aumentou o número de células FNDC5-positivas tanto no GD total quanto nas sub-regiões ventrais e dorsais do GD hipocampal. Finalmente, avaliamos o imunoconteúdo do fragmento C-terminal de FNDC5 e de FNDC5/irisina no hipocampo e encontramos um maior imunoconteúdo no grupo submetido ao mesmo protocolo de exercício físico. Conjuntamente, nossos resultados sugerem que FNDC5/irisina pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo efeito tipo-antidepressivo e pró-neurogênico deste protocolo de exercício físico.

**Palavras-chave:** Efeito tipo-antidepressivo. Neurogênese. Irisina. Exercício físico. Via PGC1 $\alpha$ /FNDC5/BDNF.

## ABSTRACT

Depression is one of the most prevalent psychiatric disorders in society and is associated with multiple pathophysiological causes, such as changes in neurotransmitter levels and reduced bioavailability of neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF). These events lead to morphofunctional changes in the hippocampus and prefrontal cortex, thereby affecting neuroplasticity, especially adult hippocampal neurogenesis. Physical exercise is a non-pharmacological strategy that may be used as an alternative and/or concomitant to treatment with antidepressant drugs, since it is able to produce antidepressant and pro-neurogenic effects. Therefore, the aim of this thesis was to investigate the potential antidepressant-like effect of irisin, a myokine which is a result of muscle contraction after physical exercise. Irisin is originated from a transmembrane protein (fibronectin type III domain-containing protein 5 - FNDC5) and after cleavage and glycosylation is released into the extracellular space having an effect on distant organs such as the brain. The present Thesis is presented in two chapters aimed to elucidate the cellular and molecular mechanisms by which irisin per se and after a protocol of physical exercise. The first Chapter aimed to investigate the cellular and molecular mechanisms by which irisin and BDNF elicit antidepressant-like effect. The second Chapter investigated the effect of endogenous produced irisin following endurance physical exercise protocol on neuroplasticity parameters related to adult hippocampal neurogenesis. The results of the first Chapter demonstrated a reduction of immobility time in the TST and FST in male C57BL/6 mice after irisin administration (0.5 e 1 ng/mice, i.c.v.), as well as a reduction in the immobility time in the TST after injection of BDNF (0.25 µg/mice, i.c.v.), an effect that was sustained until 6 hours after a single administration of both irisin and BDNF. The antidepressant-like effect of irisin and BDNF are associated with modulation of PGC1- $\alpha$ , FNDC5 and BDNF genes in the prefrontal cortex and hippocampus of mice, reinforcing the importance of these molecular targets in mood disorders. In the second Chapter of this Thesis, female Swiss mice were submitted to aerobic endurance training protocol for four weeks in treadmill running. After the protocol it was verified a reduction of immobility time in the TST and FST without altering locomotion in the OFT, and this antidepressant-like effect was accompanied by an increase in cell proliferation, neuronal differentiation and survival of hippocampal cells in mice. Of note, the pro-neurogenic effect was observed both in the dorsal and ventral

aspects of the hippocampal dentate gyrus (DG). Moreover, endurance physical exercise protocol also resulted in an increased number of FNDC5-positive cells in the entire hippocampal DG, as well as, in both aspects evaluated separately. Finally, the immunoccontents of FNDC5 C-terminal and FNDC5/irisin in the hippocampus of mice were higher after endurance physical exercise protocol. Together, our results suggest that FNDC5/irisin may be implicated, at least in part, in the antidepressant-like and pro-neurogenic effects of endurance physical exercise.

**Keywords:** Antidepressant-like effect. Neurogenesis. Irisin. Physical exercise. PGC1 $\alpha$ /FNDC5/BDNF pathway.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hipótese neurotrófica da depressão .....	29
Figura 2 - Neurogênese hipocampal adulta .....	36
Figura 3 - Benefícios do exercício físico de <i>endurance</i> para o cérebro .....	43
Figura 4 - Irisina resultante da contração muscular.....	55
Figura 5 - Efeito da administração de irisina i.c.v. nas doses de 0,1-1ng/camundongo .....	66
Figura 6 - Efeito da administração de irisina i.c.v. nas doses de 0,1-1ng/camundongo .....	67
Figura 7 - Efeito da administração de irisina i.c.v. (1ng/camundongo) no TSC (A) e no TCA (B) 30min, 1, 6 e 24 horas após a administração ...	68
Figura 8 - Efeito da administração de irisina (1 ng/m/ camundongo, i.c.v.) na expressão gênica de PGC1- $\alpha$ e FNDC5 .....	69
Figura 9 - Efeito da administração de irisina (1 ng/camundongo, i.c.v.) na expressão de RNAm de BDNF e nos níveis de BDNF.....	70
Figura 10 - Efeito da administração de BDNF i.c.v. (0,25 $\mu$ g/camundongo) 1 e 6 horas após a administração .....	71
Figura 11 - Efeito da administração de BDNF (0,25 $\mu$ g/camundongo, i.c.v.) na expressão do RNAm de PGC1- $\alpha$ e FNDC5 .....	72
Figura 12 - Efeito da administração BDNF (0,25 $\mu$ g/camundongo, i.c.v.) na expressão do RNAm e níveis de BDNF. ....	74
Figura 13 - Linha do tempo dos procedimentos experimentais.....	89
Figura 14 - Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> na imobilidade de camundongos.....	91
Figura 15 - Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> na proliferação celular na ZSG do GD hipocampal .....	93
Figura 16 - Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> na diferenciação neuronal no GD hipocampal .....	94
Figura 17 - Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> na sobrevivência de novas células geradas no GD hipocampal .....	96
Figura 18 - Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> no número de células positivas para o fragmento C-terminal de FNDC5.....	97
Figura 19 - Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> no imunoc conteúdo de proteínas .....	98



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1– Resumo dos resultados neuroquímicos obtidos no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos após a administração i.c.v. de irisina ou BDNF.....	75
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt – Proteína cinase B  
AMPC – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
AMPK – Proteína cinase dependente de AMPC  
ANOVA – Análise de variância  
ATP – Trifosfato de adenosina  
BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo  
BHE – Barreira hematoencefálica  
BrdU – 5-bromo-2'-desoxiuridina  
CA3 – *Cornu Ammonis* 3  
CaMK-2 – Proteína cinase dependente do complexo Cálcio/calmodulina II  
cDNA – DNA complementar  
CREB – Proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPC  
CUS – Estresse crônico imprevisível  
DAB – 3,3'-diaminobenzidina  
DCX – Doublecortina  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
E.P.M – Erro padrão da média  
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial  
FNDC5 – Fibronectina tipo III contendo o domínio 5  
FNIII – Fibronectina III  
GABA – Ácido gama-aminobutírico  
GD – Giro denteado  
GLUT1 – Transportador de glicose 1  
GSK-3 $\beta$  – glicogênio sintase cinase 3 $\beta$   
HPA – Hipotálamo-hipófise-adrenal  
i.c.v. – Intracerebroventricular  
i.p. – Intraperitoneal  
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1  
LTP – Potenciação de longa duração  
mTOR – Proteína alvo mecanístico da rapamicina  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
PFA – Paraformaldeído  
PGC1 $\alpha$  – Coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PI3K – Fosfatidilinositol 3-cinase  
PKA – Proteína cinase A

PKC – Proteína cinase C  
qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa  
RNA – Ácido ribonucleico  
SNC – Sistema nervoso central  
SSRIs – Inibidores seletivos de recaptção de serotonina  
TDM – Transtorno depressivo maior  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
tPA – Plasminogênio tecidual  
TrkB – Receptor tropomiosina cinase B  
UCP1 – Proteína desacopladora 1  
VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial  
VEGFR2 – Receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2  
VO<sub>2</sub> – Consumo de oxigênio pelos tecidos  
ZSG – Zona subgranular  
ZSV – Zona subventricular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1	DEPRESSÃO.....	25
1.2	NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL ADULTA .....	31
1.3	EXERCÍCIO FÍSICO.....	38
<b>1.3.1</b>	<b>Prováveis mecanismos pelos quais o exercício físico induz a neurogênese hipocampal adulta</b> .....	<b>44</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Exercício físico na depressão: O papel do BDNF</b> .....	<b>46</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Exercício físico e miocinas</b> .....	<b>48</b>
1.4	IRISINA .....	50
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>57</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA IRISINA</b> .....	<b>59</b>
3.1	OBJETIVOS .....	59
<b>3.1.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>59</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>59</b>
3.2	METODOLOGIA .....	60
<b>3.2.1</b>	<b>Animais</b> .....	<b>60</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Testes comportamentais</b> .....	<b>61</b>
3.2.2.1	Teste do nado forçado (TNF).....	61
3.2.2.2	Teste da suspensão pela cauda (TSC) .....	61
3.2.2.3	Teste do campo aberto (TCA).....	61
3.2.2.4	Administração intracerebroventricular (i.c.v.) .....	61
<b>3.2.3</b>	<b>Testes bioquímicos</b> .....	<b>62</b>
3.2.3.1	Extração de RNA, cDNA e Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qRT-PCR).....	62
3.2.3.2	Dosagem de BDNF .....	63
<b>3.2.4</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>64</b>
3.3	RESULTADOS.....	65
<b>3.3.1</b>	<b>Efeito da administração de irisinina no comportamento de camundongos submetidos ao TSC, TNF e TCA</b> .....	<b>65</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Efeito da administração de irisinina na expressão gênica de PGC1-<math>\alpha</math> e FNDC5</b> .....	<b>68</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Influência da administração de irisinina na expressão gênica de BDNF e nos níveis de BDNF</b> .....	<b>69</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Efeito da administração de BDNF na resposta comportamental de camundongos no TSC e TCA</b> .....	<b>71</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Influência da administração de BDNF no RNAm de PGC1-<math>\alpha</math> e FNDC5 e nos níveis de BDNF</b> .....	<b>72</b>

3.3.6	Influência da administração de BDNF na expressão genica e níveis proteicos de BDNF.....	73
3.4	DISCUSSÃO .....	75
4	<b>CAPÍTULO II: EFEITO PRÓ-NEUROGÊNICO E ANTIDEPRESSIVO DE UM PROTOCOLO DE EXERCÍCIOS FÍSICOS DE <i>ENDURANCE</i> EM CAMUNDONGOS: O POSSÍVEL PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO FNDC5/IRISINA .....</b>	<b>81</b>
4.1	OBJETIVOS .....	82
4.1.1	Objetivo geral.....	82
4.1.2	Objetivos específicos .....	82
4.2	METODOLOGIA .....	82
4.2.1	Animais .....	82
4.2.2	Protocolo experimental do exercício físico de <i>endurance</i> .....	83
4.2.3	Administração de BrdU.....	84
4.2.4	Teste de suspensão pela cauda (TSC).....	84
4.2.5	Teste do campo aberto (TCA).....	84
4.2.6	Teste do nado forçado (TNF) .....	85
4.2.7	Processamento do tecido .....	85
4.2.8	Ensaio de imuno-histoquímica.....	85
4.2.9	Quantificação morfológica .....	87
4.2.10	Imunodeteção de proteínas por <i>Western Blotting</i> .....	87
4.2.11	Análise estatística.....	89
4.3	RESULTADOS .....	90
4.3.1	Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> no comportamento de camundongos submetidos ao TSC, TNF e TCA .....	90
4.3.2	Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> na proliferação celular no GD hipocampal.....	91
4.3.3	Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> na diferenciação neuronal no GD hipocampal.....	94
4.3.4	Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> na sobrevivência celular do GD hipocampal.....	95
4.3.5	Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> na expressão do fragmento C-terminal de FNDC5 no GD hipocampal.....	96
4.3.6	Efeito do exercício físico de <i>endurance</i> no imunocontéudo do fragmento C-terminal de FNDC5 e de FNDC5/irisina .....	98
4.4	DISCUSSÃO .....	99
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E FUTURAS PERSPECTIVAS .....</b>	<b>107</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>111</b>

## APRESENTAÇÃO

Esta Tese de Doutorado está organizada na forma de uma introdução geral, contendo o embasamento teórico relacionado aos experimentos realizados, justificativa, seguida por dois capítulos separados. Cada capítulo contém uma breve introdução, objetivos, seus respectivos materiais e métodos, resultados, discussão e os dados a respeito do artigo a que deram origem. Ao final apresentamos a conclusão e as futuras perspectivas referentes aos estudos realizados. As referências bibliográficas foram organizadas em seção única. Os tratamentos, protocolo de exercício físico, avaliações comportamentais, bioquímicas e de imuno-histoquímica referentes aos dois capítulos foram conduzidos no Laboratório de Neurobiologia da Depressão. As avaliações das imagens referentes aos estudos de imuno-histoquímica, bem como as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB- UFSC).



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DEPRESSÃO

O Transtorno Depressivo Maior (TDM), que será tratado nesta Tese como depressão, é um transtorno psiquiátrico comum, recorrente e debilitante, considerado um problema social que gera grande impacto econômico e reduz consideravelmente a qualidade de vida dos indivíduos (VOS et al., 2015). No Brasil é observada uma elevada prevalência da depressão, tendo os maiores índices da América Latina. Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que cerca de 11,2 milhões de pessoas acima de 18 anos receberam o diagnóstico de depressão no ano de 2013 (IBGE, 2013). São cerca de 300 milhões de pessoas acometidas mundialmente (1 a cada 6 adultos ao longo da vida), esses dados são 18% maiores que há dez anos (BROMET et al., 2011; OTTE et al., 2016). A depressão é mais comum em mulheres (5,1%) do que em homens (3,6%) e afeta cerca de 4,4% da população adulta em todo o mundo (WHO, 2015). Na sua forma mais severa, a depressão pode levar ao suicídio, sendo que o risco de suicídio é quase 20 vezes maior em pacientes depressivos do que na população em geral (CHESNEY; GOODWIN; FAZEL, 2014). Estima-se que cerca de 50% dos 800.000 suicídios que ocorrem anualmente no mundo estão associados aos episódios depressivos (WHO, 2016).

Devido à ausência de biomarcadores, o diagnóstico da depressão ainda é baseado na observação clínica do paciente. Desta forma, este transtorno é caracterizado por pelo menos um discreto episódio depressivo, com duração mínima de duas semanas que envolva claras mudanças de humor, interesses e prazer, alterações na cognição e sintomas tais como distúrbios do sono e apetite (OTTE et al., 2016). De acordo com critérios do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais V (DSM-V), um conjunto de sintomas clínicos é necessário para a caracterização da depressão, dentre eles: 1) humor deprimido na maior parte do dia; 2) acentuada diminuição do interesse ou prazer em todas ou quase todas as atividades (anedonia); 3) perda ou ganho significativo de peso sem estar fazendo alterações na dieta ou hábito de vida (p. ex., uma alteração de mais de 5% do peso corporal em um mês); 4) insônia ou hipersônia; 5) agitação ou retardo psicomotor; 6) fadiga ou perda de energia; 7) sentimentos de inutilidade ou culpa excessiva (que podem ser delirantes); 8) capacidade diminuída para pensar ou se concentrar, ou indecisão; 9) pensamentos recorrentes de

morte (não somente medo de morrer), ou ideação suicida. Para se confirmar o diagnóstico devem estar presentes no mínimo cinco dos nove sintomas, e pelo menos um dos dois primeiros sintomas por um período mínimo de duas semanas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A etiologia da depressão é multifatorial, sendo influenciada por uma série de fatores, com destaque para os fatores genéticos (GESCHWIND; FLINT, 2015), e ambientais, tais como traumas na infância (LI; D'ARCY; MENG, 2015) além do estresse na vida adulta (SAPOLSKY, 2000). Em resposta ao estresse, ocorrem alterações no eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA), no sistema nervoso autônomo e no sistema imune. Como consequência observam-se neuroinflamação, neurotransmissão alterada, entre outros comprometimentos (KUPFER; FRANK; PHILLIPS, 2012).

A heterogeneidade na sintomatologia da depressão pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo sexo dos indivíduos afetados. Por exemplo, estudos indicam que, em comparação aos homens, as mulheres com depressão são mais propensas a apresentar maior gravidade dos sintomas (MARCUS et al., 2008, 2005), além de diferenças nos níveis de interleucinas, de neurotrofinas como o BDNF, de neurotransmissores como a serotonina, de neuromoduladores como o neuropeptídeo Y e de hormônios como a leptina e o cortisol (LABAKA et al., 2018). Os sintomas somáticos e cognitivo-afetivos são mais comumente relatados em mulheres do que em homens (MARCUS et al., 2008; PENNINX et al., 2013). As mulheres também são mais propensas a apresentar a maioria dos subtipos de depressão (BOGREN et al., 2017), incluindo a depressão atípica, além de sintomas como a hipersônia, ganho de peso e fadiga (BLANCO et al., 2012; MARCUS et al., 2005; SCHUCH et al., 2014). Uma exceção é a depressão com características melancólicas, que representa menos de 1% dos casos de depressão, e é mais prevalente em homens do que em mulheres (BOGREN et al., 2017; HILDEBRANDT et al., 2003). O sexo também pode influenciar as comorbidades em indivíduos com diagnóstico primário de depressão. Neste sentido, as mulheres têm maiores taxas de comorbidade depressão e ansiedade (SCHUCH et al., 2014) enquanto que os homens apresentam taxas mais altas de comorbidade depressão e uso de drogas de abuso (MARCUS et al., 2008; SCHUCH et al., 2014).

Cabe ressaltar um estudo de Kong et al., (2013) que encontrou padrões específicos em diferentes sexos, avaliou anormalidades na morfologia córtico-límbico-estriatal em indivíduos com depressão não tratada (KONG et al., 2013). Especificamente, anormalidades pré-

límbicas foram encontradas principalmente em mulheres, enquanto anormalidades pré-fronto-estriatal foram encontradas principalmente em homens, apontando para diferenças sexuais nestes circuitos neuronais (KONG et al., 2013). Esses achados podem ser relevantes para as diferenças sexuais na apresentação de sintomas clínicos da depressão, como por exemplo, disfunção pré-fronto-límbica pode estar relacionada à maior prevalência de ansiedade em mulheres (ETKIN, 2010), enquanto a disfunção pré-frontal-estriatal pode estar relacionada à maior prevalência de uso de substâncias de abuso em homens (LIMBRICK-OLDFIELD; VAN HOLST; CLARK, 2013).

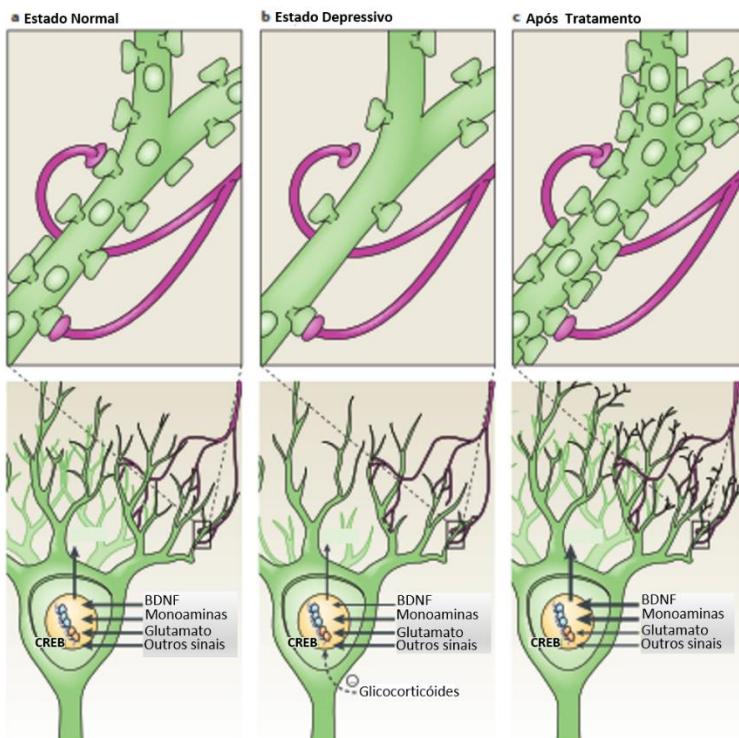
Apesar dos avanços nas pesquisas que buscam a compreensão da neurobiologia da depressão nenhum dos mecanismos estabelecidos, de forma isolada, são capazes de explicar todos os aspectos etiológicos do transtorno (OTTE et al., 2016). Neste sentido, a primeira hipótese foi postulada em 1960 e relaciona a depressão com baixos níveis sinápticos de monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina). No entanto, embora os agentes antidepressivos aumentem a biodisponibilidade destes neurotransmissores na fenda sináptica agudamente, ou seja, horas após a administração, os efeitos antidepressivos muitas vezes só são evidentes após várias semanas de tratamento (BERTON; NESTLER, 2006; WONG; LICINIO, 2001). Além disso, os fármacos causam inúmeros efeitos adversos e a remissão completa dos sintomas atinge apenas cerca de 50% dos indivíduos afetados (BRUNELLO et al., 2002).

Subsequentemente, na tentativa de esclarecer a demora entre o início do tratamento com antidepressivos clássicos (baseado na modulação de monoaminas) e a melhora dos sintomas depressivos nos pacientes, sugeriu-se que o efeito antidepressivo pode ser associado às alterações moleculares que ocorrem após a modulação da neurotransmissão (DUMAN; HENINGER; NESTLER, 1997). A hipótese neurotrófica da depressão foi postulada a partir dos estudos das vias de sinalização intracelular ativadas por receptores de monoaminas, promovendo alterações na expressão gênica e propiciando a síntese de diversos fatores tróficos, entre eles o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (**Figura 1**). Estas mudanças adaptativas geradas estariam relacionadas com a neuroplasticidade, que inclui processos como arborização dendrítica, remodelagem sináptica, neurogênese e sinaptogênese (COTMAN; NIETO-SAMPEDRO, 1984; DUMAN, 2002; DUMAN; MONTEGGIA, 2006; DUMAN; DUMAN, 2015; KEMPERMANN, 2002). Em camundongos uma única infusão direta de BDNF no hipocampo é capaz de produzir um efeito antidepressivo

similar ao obtido com a administração crônica de fármacos antidepressivos (SHIRAYAMA et al., 2002). Existe uma parcela da população de pacientes diagnosticados com depressão (aproximadamente 25%) que é portadora de um polimorfismo no gene codificante de BDNF (substituição de valina por metionina na posição 66), o que leva a prejuízos na síntese e liberação de BDNF e assim parecem estar associados a um aumento na susceptibilidade à depressão (EGAN et al., 2003; ZHANG et al., 2015a).

Após o tratamento antidepressivo ocorre a ativação dos receptores serotoninérgicos e noradrenérgicos, o que leva a ativação de vias de sinalização intracelular mediadas pela proteína cinase dependentes de AMPc (PKA), proteínas cinase C (PKC) ou a proteína cinase B (Akt), proteína cinase dependente do complexo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina II (CaMK-2), e ativação de outras cinases entre elas da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPKK), que levam a fosforilação e ativação da proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc (CREB), favorecendo a síntese de fatores neurotróficos como o BDNF (NESTLER et al., 2002). As análises genéticas em pacientes com depressão e vítimas de suicídio, demonstram um comprometimento na sinalização intracelular mediada pelo BDNF hipocampal (EGAN et al., 2003) e mudanças na expressão da sinalização serotoninérgica (SHELTON et al., 2009) reforçando a ideia da hipótese neurotrófica da depressão.

Figura 1. Hipótese neurotrófica da depressão.



Legenda: Mecanismos neurotróficos na depressão e ação de antidepressivos. a ) Representação esquemática de um neurônio piramidal do hipocampo e suas interações com neurônios glutamatérgicos, monaminérgicos e outros tipos de neurônios. A regulação por BDNF que é derivado do hipocampo e de outras áreas do cérebro é mostrada. b) O estresse severo causa alterações morfológicas e neuroquímicas nestes neurônios incluindo a redução da arborização dendrítica e a redução da expressão de BDNF (fatores que podem mediar efeitos nos dendritos). A redução do conteúdo de BDNF pode ocorrer pelo aumento dos níveis de glicocorticóides durante uma situação de estresse, o que pode interferir nos mecanismos transcricionais mediados por CREB. c) A ação de antidepressivos produz efeitos opostos aos observados na figura b, pois eles são capazes de aumentar a arborização dendrítica e a expressão de BDNF de neurônios hipocâmpais. Este último efeito parece ser mediado, pelo menos em parte, pela ativação do fator de transcrição CREB. Devido a estas ações, antidepressivos podem prevenir ou reverter os efeitos causados pelo estresse no hipocampo e melhorar os sintomas de depressão. Adaptado de Berton e Nestler (2006).

Estudos sugerem que as alterações morfológicas observadas no encéfalo de pacientes diagnosticados com depressão, como por exemplo, a redução do volume de estruturas límbicas como o hipocampo e o córtex pré-frontal, além de atrofia neuronal, dendrítica e glial, parecem estar associados a um decréscimo dos níveis de BDNF (KEMPTON et al., 2011; SCHMIDT; DUMAN, 2007). Devido a grande quantidade de projeções conectadas ao córtex pré-frontal e ao hipocampo, as circuitarias córtico-límbicas também são afetadas na depressão, levando a disfunções em outras estruturas encefálicas, incluindo os córtices cingulado, órbito-frontal, a amígdala, o tálamo medial, o hipotálamo e o estriado. Estes eventos por sua vez, levam a alterações cognitivas, comportamentais e neuroendócrinas que parecem estar relacionadas com a heterogeneidade dos sintomas observados na depressão (PALAZIDOU, 2012).

O cortex pré-frontal é funcionalmente conectado com muitas estruturas encefálicas para o processamento de *input* sensoriais e para mediar funções executivas e motoras. O córtex pré-frontal ventromedial e orbito-frontal estão envolvidos no processamento cognitivo do estímulo emocional originado do sistema límbico (amígdala, estriado ventral, hipocampo e hipotálamo) que por sua vez estão relacionadas a consolidação e recuperação da memória (ONGUR; PRICE, 2000; PRICE, 1999). O córtex pré-frontal participa na regulação da resposta emocional adequada ao medo ou a ansiedade. Além disso, a estrutura tem sido associada com tomada de decisão, expressão da personalidade, comportamento social e respostas hedônicas (MITTERSCHIFFTHALER et al., 2003). Estudos em neuroimagens mostraram uma redução no tamanho de diferentes sub-regiões do córtex pré-frontal em indivíduos diagnosticados com depressão (BREMNER et al. 2002; DREVETS, 2001). Corroborando com estes estudos análises em tecidos *post mortem* de pacientes com o transtorno revelam redução de neurônios, de dendritos e de células gliais, além de alterações nas sinapses do córtex pré-frontal dorsolateral e subgenual (COTTER et al., 2002; KANG et al., 2012; ONGÜR; DREVETS; PRICE, 1998; RAJKOWSKA et al., 1999).

Disfunções no córtex pré-frontal de pacientes com depressão ou modelos animais são parcialmente revertidas pelo tratamento com antidepressivos. Um tratamento com 8 semanas de escitalopram (fármaco SSRIs) reduziu uma conectividade irregular bilateral no córtex pré-frontal dorsomedial de pacientes diagnosticados com depressão (LYTTLE et al., 2015; WANG et al., 2015). Além disso, a administração de fluvoxamina (fármaco SSRIs) por duas semanas

restaurou o comprimento e a densidade dos espinhos dendríticos em ratos expostos a estresse precoce, embora não tenha alterado a espessura do córtex (LYTTLE et al. 2015). Ainda, a eletroestimulação tanto em alta quanto em baixa frequência no córtex pré-frontal ventromedial, reduz o comportamento tipo-depressivo em modelos animais de depressão (BRUCHIM-SAMUEL et al. 2016; LIM et al. 2015).

O córtex pré-frontal é conectado com a amígdala e hipocampo e a atividade nestas diferentes estruturas tem sido estudadas em pacientes com depressão. O hipocampo parece ser mais afetado em indivíduos com diagnóstico de depressão quando comparados com outros transtornos psiquiátricos, como esquizofrenia, transtorno-obsessivo compulsivo, bipolaridade e ansiedade (GOODKIND et al., 2015). Estudos em tecidos *post mortem* em pacientes vítimas de suicídio mostram uma redução dos níveis de BDNF e do receptor tropomiosina cinase B (TrkB) quando comparados aos indivíduos sem o transtorno (CASTREN, 2004). Enquanto o tratamento crônico com antidepressivos reestabelece os níveis de neurotrofinas principalmente do BDNF no córtex pré-frontal (CASTREN, 2004) e no hipocampo, além de ser capaz de induzir a neurogênese hipocampal adulta (TALIAZ et al., 2009; PICCINNI et al., 2008) e promover a remissão dos sintomas depressivos (DUMAN, 1998).

## 1.2 NEUROGÊNESE HIPOCAMPAL ADULTA

O encéfalo é capaz de adaptar-se e modificar circuitarias neurais existentes através da adição de novos neurônios ou pelo remodelamento das sinapses já existentes, evento denominado neuroplasticidade (ALTMAN; DAS, 1965). O hipocampo é uma estrutura encefálica que apresenta a capacidade de neuroplasticidade estrutural e sináptica. A plasticidade estrutural é caracterizada pelo processo de neurogênese adulta e por alterações numéricas e morfológicas dos espinhos dendríticos; e a plasticidade sináptica pelo fortalecimento, enfraquecimento e/ou remodelamento das sinapses existentes (GAGE, 2004). O hipocampo está localizado no lobo temporal de cada hemisfério encefálico, com base na morfologia celular e nas projeções de suas fibras, o hipocampo é subdividido em regiões CA (do latim *Cornu Ammonis*; organizada em sub-regiões denominadas CA1, CA2, CA3 e CA4) e no giro denteado (GD). O GD é uma estrutura trilaminar dividida em camada molecular (ocupada basicamente pelos dendritos das células granulares e polimórficas), camada granular (camada principal de células que tem corpos celulares pequenos e esféricos) e

camada polimórfica (também chamada de hilo, onde se encontram as células musgosas) (KNIERIM, 2015).

A neurogênese adulta pode ser definida como o processo de produção de novos neurônios a partir de células tronco neurais ou células progenitoras (APPLE; FONSECA; KOKOVAY, 2017). A literatura reporta que a neurogênese ocorre majoritariamente em dois nichos neurogênicos do cérebro adulto de humanos e de roedores, a zona subgranular (ZSG) no GD do hipocampo, e a zona subventricular (ZSV) nos ventrículos laterais (ALVAREZ-BUYLLA; GARCIAVERDUGO, 2002; KEMPERMANN, 2002; MING; SONG, 2011). A neurogênese é um processo dinâmico, bem regulado e dividido em fases que leva cerca de 4 a 6 semanas para ser completado. Inicia-se com a proliferação de células (quiescentes), que ocorre na ZSG do GD, seguida por migração (especificação do destino celular), diferenciação e maturação celular. A partir do processo de diferenciação na ZSG do GD, os neurônios imaturos migram para a camada granular, maturam e dão origem às células granulares que posteriormente se integrarão à circuitaria neuronal existente (GONCALVES; SCHAFFER; GAGE, 2016).

A ZSG do GD é um nicho neurogênico do cérebro adulto de mamíferos que contém células tronco neurais. Estas células progenitoras podem produzir múltiplos tipos celulares no sistema nervoso central (SNC) como neurônios, astrócitos, oligodendrócitos ou micróglia (McDONALD; WOJTOWICZ, 2005). O GD é uma fina camada, que possui um microambiente adequado para a população de células tronco neurais, localizada entre a camada de células granulares e o hilus. O ambiente da ZSG permite a proliferação de células tronco neurais enquanto promove a diferenciação de células neuronais granulares. No GD de adultos as células neuronais granulares nascidas passam por vários estágios consecutivos do desenvolvimento antes de tornarem-se funcionalmente integrados dentro da circuitaria hipocampal. Acredita-se que células do tipo I, também denominadas células do tipo glia radial representam a população de células tronco neurais progenitoras e podem gerar células que mantêm a taxa de auto-renovação (células tipo IIa) e proliferativas progenitoras intermediárias (células do tipo IIb) com características de amplificação transitória. Durante a transição da fase mitótica para pós-mitótica as células do tipo IIb podem dar origem a neuroblastos (células do tipo III) que subsequentemente se diferenciam em neurônios granulares maduros do GD (GAGE, 2004; KEMPERMANN et al., 2004). Além da população de progenitores neurais, essa área contém outros tipos de células que suportam a neurogênese, bem como uma rede vascular densa que é fortemente

associada às células tronco neurais (GONÇALVES; SCHAFFER; GAGE, 2016). A sobrevivência celular é predominantemente de fenótipos neuronais sendo de aproximadamente 75%, composta principalmente por células granulares glutamatérgicas e também alguns interneurônios ácido gama-butíricos (GABAérgicos). Uma pequena proporção se diferencia em astrócitos (15%), oligodendrócitos ou micróglia (STEINER et al., 2006; ZHAO et al., 2008).

Assim o GD é uma área do cérebro caracterizada por uma ampla e densa população de neurônios glutamatérgicos e células granulares (DANIELSON et al., 2016; GONÇALVES; SCHAFFER; GAGE, 2016; JUNG; MCNAUGHTON, 1993). É uma importante região de entrada para o hipocampo e, portanto, acredita-se que ele desempenhe um papel essencial nas tarefas de aprendizado, de memória episódica e de navegação espacial associadas a essa estrutura. As células tronco do GD recebem seus *inputs* das fibras da via perfurante originadas na camada II do córtex entorrinal lateral e medial. Além disso, recebem inputs do hipocampo contralateral, diversos aferentes neuromodulatórios, mais particularmente inputs colinérgicos provenientes do *septum* e *input* dopaminérgicos vindos do mesencéfalo (DU et al., 2016), *feedback* vindos de CA3 (VIVAR et al., 2012), além de *input* glutamatérgicos de células musgosas, e inibitórios vindos de interneurônios do hilus, bem como das camadas granular e molecular.

Durante a maturação das células tronco neuronais ocorre uma transição do neurotransmissor GABA que se converte de excitatório em inibitório e de *input* glutamatérgicos aproximadamente 2-3 semanas após o nascimento. A trajetória no desenvolvimento de um novo neurônio é acompanhada pela expressão de marcadores moleculares específicos de cada fase do ciclo celular, estes marcadores permitem o estudo da neurogênese (VON BOHLENUND UND HALBACH, 2007). Por exemplo, o primeiro precursor celular na ZSG apresenta propriedades de glia radial (SERI et al., 2001), que expressa entre outros marcadores de proliferação o Ki-67 (KEE et al., 2002) presente nas fases S, G2 e M do ciclo celular (KEE et al., 2002; ZACCHETTI et al., 2003). A proteína associada a microtúbulos doublecortina (DCX) marca células progenitoras intermediárias e neurônios imaturos (frequentemente chamados de neuroblastos). Em roedores o DCX caracteriza uma fase intermediária da neurogênese adulta entre o estágio de células precursoras e neurônios imaturos (KUHN et al., 2016). Além dos marcadores endógenos, existem também marcadores exógenos para estudo das fases da neurogênese, entre eles a bromodeoxiuridina (BrdU) que é comumente utilizado em estudos pré-clínicos para marcar a

proliferação e ou sobrevivência celular. O BrdU é incorporado nas células mitóticas durante a fase de síntese (dentro de 2 horas após a injeção), sendo assim transmitido para as células filhas, portanto dependendo do intervalo de tempo no qual foi administrado o composto e a perfusão dos animais é possível verificar tanto proliferação quanto sobrevivência celular (COOPER-KUHN; GEORG KUHN, 2002).

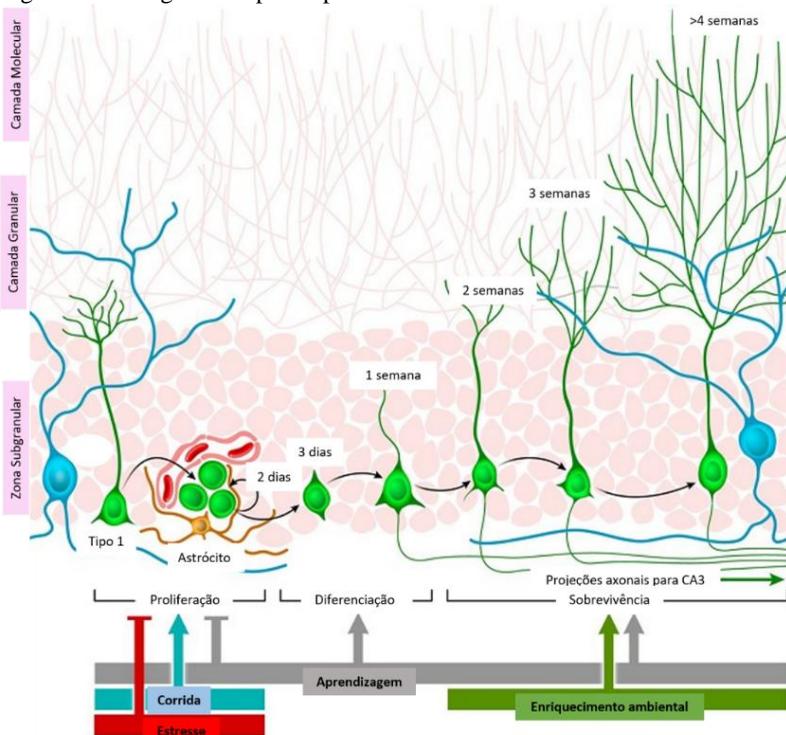
A neurogênese foi descrita pela primeira vez por Joseph Altman, em 1965 (ALTMAN; DAS, 1965), entretanto só foi aceita pela comunidade científica no ano de 1998 através da publicação do estudo realizado por Eriksson e colaboradores em tecidos *post mortem* de pacientes. Os autores processaram o tecido cerebral de humanos adultos e verificaram que novas células estavam proliferando e se diferenciando em neurônios. Neste trabalho os pacientes receberam uma injeção do análogo da timidina BrdU, que é incorporado ao ácido desoxirribonucleico (DNA) de células precursoras em divisão e pode ser detectado imunohistologicamente, assim um neurônio positivo de BrdU, deu origem a uma célula que sofreu divisão no momento em que o BrdU foi administrado (ERIKSSON et al., 1998). Mais tarde Palmer e colaboradores (2001) evidenciaram que células tronco com potencial neurogênico podem ser isoladas do hipocampo de humanos adultos (PALMER et al., 2001). Assim, ao longo dos anos vários estudos utilizam a técnica de imunohistoquímica para detectar células que expressam marcadores de proliferação celular em tecido *post mortem* de cérebros humanos (BOEKHOORN; JOELS LUCASSEN, 2006; DENNIS et al., 2016; LIU et al., 2008; MATHEWS et al., 2017).

Enquanto a literatura reporta que cerca de 700 novos neurônios são gerados por GD do hipocampo de humanos adultos por dia (SPALDING et al., 2013), dois estudos recentemente publicados reacenderam o debate científico sobre a existência da neurogênese adulta em humanos. Sorrells e colaboradores (2018) mostraram que a neurogênese cai para níveis indetectáveis em tecidos *post mortem* de 17 pacientes controles e 12 pacientes pós cirúrgicos portadores de epilepsia entre 18 e 77 anos (SORRELLS et al., 2018). Já Boldrini e colaboradores (2018), avaliaram 28 amostras de tecidos *post mortem* de hipocampo adultos entre 14 a 79 anos, sem comprometimento cognitivo ou doença neuropsiquiátrica (BOLDRINI et al., 2018). Estes autores concluíram que a neurogênese adulta é persistente, no entanto, os benefícios dos novos neurônios na cognição humana estariam sendo superestimados, pois ocorre um declínio tanto no *pool* de células tronco quiescentes, quanto na angiogênese e neuroplasticidade. Embora ambos os estudos apresentem limitações, estes podem servir de orientação para

futuras análises, que visem avaliar, por exemplo, fenótipos celulares e possíveis trajetórias de diferenciação acompanhando a sequência do ácido ribonucleico (RNA) de uma única célula (LEE; THURET, 2018).

Assim, a neurogênese é considerada um complexo processo biológico que envolve neurotransmissores, cascatas de sinalização e mecanismos moleculares finamente regulados para que os neurônios proliferem, diferenciem e possam integrar-se a circuitaria neuronal existente. Os novos neurônios originados participarão em processos de aprendizagem, de memória, de medo condicionado, e de modulação das emoções (BRAUN; JESSBERGER, 2014; VAN PRAAG et al., 2002). De especial interesse, os pacientes diagnosticados com depressão têm prejuízos na neurogênese hipocampal adulta (DRANOVSKY; HEN, 2006; MILLER; HEN, 2015). Assim a neurogênese é influenciada positiva ou negativamente por fatores intrínsecos ou extrínsecos (**Figura 2**). Essas manipulações externas são conhecidas por impactar positivamente e negativamente os níveis de neurogênese ao longo da vida dos mamíferos. Alguns dos reguladores positivos mais proeminentes da neurogênese hipocampal são a prática de exercícios físicos (THARMARATNAM et al., 2017), a dieta, os fármacos antidepressivos (MALBERG et al., 2000; SANTARELLI et al., 2003) e o enriquecimento ambiental em modelos animais. Por outro lado, fatores como o estresse crônico e os declínios cognitivos decorrentes do envelhecimento, bem como doenças neurodegenerativas, trazem prejuízos à neurogênese (MILLER; HEN, 2015; KUHN et al., 1996). Em ambos os casos, as manipulações desses elementos comuns da vida desempenham um papel significativo na maneira como a neurogênese do hipocampo adulto é regulada.

Figura 2. Neurogênese hipocampal adulta.



Legenda: A neurogênese hipocampal adulta que ocorre na zona subgranular (ZSG) pode ser dividida em 3 grandes etapas. A primeira etapa consiste na proliferação, na qual células Tipo I, células da glia radial ou precursores quiescentes neurais se dividem de forma assimétrica originando as células do que irão manter a taxa celular de auto-renovação (células tipo IIa) e os progenitores intermediários (células do tipo IIb) que apresentam características transitórias de amplificação, ambas tem a capacidade de se proliferar (segunda etapa). Esta etapa é acompanhada por um grande aporte de vasos sanguíneos e pelo suporte fornecido pelos astrócitos nesta região, entre o terceiro dia e a quarta semana as células assumem ou um fenótipo neuronal ou astrocitário. As células do tipo IIb podem dar origem a neuroblastos (células do tipo III), que subsequentemente podem se diferenciar em neurônios maduros. A terceira etapa é a da sobrevivência, na qual as células que se diferenciaram em neurônios passam por modificações morfológicas e de plasticidade sináptica, com axônios projetando-se para as regiões CA3. A neurogênese pode ser regulada por muitos fatores comportamentais. O exercício físico de corrida é um dos mais potentes indutores de neurogênese, visando a proliferação de células progenitoras

neurais. O enriquecimento ambiental tem um efeito complementar, aumentando a sobrevivência dos neurônios em um estágio crítico de sua maturação. Em contraste, o estresse é um regulador negativo do nascimento de novos neurônios, reduzindo a proliferação. Imagem adaptada de Aimone et al. (2014).

O hipocampo é funcionalmente constituído de duas sub-regiões: a parte dorsal e ventral. Em ratos e em camundongos, o hipocampo se estende ao longo de um eixo rostro caudal e um eixo dorso ventral, estando o hipocampo dorsal no polo septal, enquanto o hipocampo ventral no polo temporal do hipocampo. As secções coronais mais rostrais do hipocampo de roedores contêm apenas hipocampo dorsal, enquanto secções coronais mais caudais contêm tanto o hipocampo ventral como partes do hipocampo dorsal. Nos seres humanos, o polo septal está localizado posteriormente, enquanto o polo temporal está localizado anteriormente, portanto, o hipocampo anterior em humanos é análogo ao hipocampo ventral em roedores, enquanto o hipocampo posterior é análogo hipocampo dorsal em roedores (FANSELOW; DONG, 2010; GULYAEVA, 2018; GULYAEVA, 2015). O hipocampo dorsal está envolvido principalmente na aprendizagem, memória e navegação espacial, enquanto o hipocampo ventral está mais ligado ao comportamento emocional e à regulação do eixo de estresse neuroendócrino. As alterações funcionais e moleculares induzidas pelo estresse no hipocampo ocorrem nas principais doenças mentais e neurológicas, incluindo depressão e demência (BANNERMAN et al., 2004; DEGROOT; TREIT, 2004; PAXINOS, 2010).

O estudo de Fanselow e Dong (2010) mostrou que a dissociação funcional ao longo do eixo septo-temporal do hipocampo é muito mais complexa do que apenas um simples paradigma de “aprendizado versus emoções”, embora, de fato, um conjunto de evidências indicam que o hipocampo dorsal está mais envolvido na aprendizagem / memória e navegação espacial, enquanto o hipocampo ventral está mais ligado ao comportamento emocional e à regulação do eixo HPA . Em estudos clínicos e translacionais, o hipocampo dorsal tem sido relacionado com neurodegeneração e demência, enquanto existe uma associação íntima do hipocampo ventral com resposta ao estresse, depressão e outros transtornos mentais (FANSELOW; DONG, 2010).

O hipocampo ventral possui uma conectividade mais intensa com a amígdala e os núcleos endócrino e autonômico do hipotálamo e projeta-se preferencialmente nos núcleos medial, intercalado e basomedial da amígdala e na área de transição da amígdala-hipocampo, enquanto o hipocampo dorsal tem eferências nas regiões mais laterais da

amígdala. As projeções do córtex infra-límbico e pré-límbicos envolvidos na regulação emocional se aproximam do hipocampo ventral com vias de entrada para as partes ventro mediais do córtex entorrinal. Por outro lado, o córtex cingulado anterior e o córtex retrosplenial parecem estar envolvidos no processamento espacial devido as suas projeções estarem relacionadas primariamente para o hipocampo dorsal via partes dorsais e laterais do córtex entorrinal. A conectividade hipocampal parece apresentar uma diferença na composição de neurotransmissores ao longo do eixo do hipocampo, sendo a inervação colinérgica e dopaminérgica mais densa no hipocampo dorsal, enquanto as concentrações de noradrenalina e serotonina são mais altas no hipocampo ventral (GRIGORYAN; SEGAL, 2016).

Estudos sobre modelos de estresse e depressão em roedores buscam elucidar o envolvimento do hipocampo ventral no estresse e em doenças psiquiátricas (SCHMAAL et al., 2016). Os dados sobre os principais sistemas de neurotransmissores, neurotrofinas, neurogênese, plasticidade, potenciação de longa duração (LTP) e receptores glicocorticóides sugerem o envolvimento específico do hipocampo ventral no desenvolvimento de psicopatologias (GULYAEVA, 2014; GULYAEVA, 2015). Além disso, os efeitos do estresse e dos antidepressivos na neurogênese ao longo do eixo longitudinal do hipocampo sugerem uma regulação preferencial da neurogênese no hipocampo ventral, o que contribui para a resiliência ao estresse e efeito tipo-antidepressivo (O'LEARY; CRYAN, 2014). Em um estudo de revisão, Tanti e Belzung (2013), relatam que modelos animais de depressão causam maiores danos no hipocampo ventral do que no hipocampo dorsal. Esses efeitos foram específicos aos estágios de proliferação ou sobrevivência celular. SSRIs atuaram positivamente na neurogênese adulta em ambas porções do GD hipocampal (dorsal e ventral), embora alguns outros compostos com ação antidepressiva (como agomelatina) afetaram especificamente o hipocampo ventral. De especial interesse para este trabalho, abordagens não-farmacológicas que resultem em efeito antidepressivo, como o exercício físico, podem estimular a neurogênese tanto no hipocampo ventral quanto no dorsal (TANTI; BELZUNG, 2013).

### 1.3 EXERCÍCIO FÍSICO

Podemos definir o exercício físico como atividade física planejada, estruturada e repetitiva que tem como objetivo melhorar ou manter a saúde física (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON,

1985). O exercício físico está associado a alterações fisiológicas e anatômicas no cérebro, como por exemplo, aumento da neurogênese e do volume hipocampal, além de promoção da sinaptogênese (ERICKSON; KRAMER, 2009, ROSSI et al., 2006; SIERAKOWIAK et al., 2015). Cabe destacar que as alterações promovidas por fármacos antidepressivos são semelhantes aquelas reportadas por estudos clínicos e pré-clínicos que avaliam os efeitos benéficos da prática de exercício físico como estratégia terapêutica antidepressiva (MURA et al., 2014). Os efeitos parecem ser dependentes, pelo menos em parte, da regulação positiva da liberação de monoaminas (ENGESSER-CESAR; ANDERSON; COTMAN, 2007), além de alterações na sinalização neurotrófica, principalmente aumento de BDNF (FANG et al., 2013; SCHMIDT; DUMAN, 2010) resultando em melhora das funções hipocâmpais (ERICKSON et al., 2010).

Quando se prescrevem exercícios físicos consideram-se os componentes do treinamento: 1) frequência (número de treinos ou sessões semanais); 2) tipo de exercício físico (aeróbio ou anaeróbio); 3) intensidade (nível de esforço exigido na sessão de treinamento); 4) volume (considera as variáveis tempo/velocidade/repetições/descanso); 5) duração (tempo pelo qual o treinamento pode ser sustentado). Estes parâmetros determinam a adaptação e os benefícios relacionados à aptidão física e saúde mental (GARBER et al., 2011). O termo aptidão física engloba componentes relacionados a saúde e habilidades físicas, como a aptidão cardiorrespiratória, a força muscular e a força muscular *endurance*, além de composição corporal, de flexibilidade e de aptidão neuromotora (BAKER; CORMICK; ROBERGS, 2010).

O exercício físico foi classificado em aeróbio e anaeróbio segundo os substratos metabólicos predominantes durante a prática (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE, 2006). São exemplos de exercícios físicos aeróbios: caminhar, correr, andar, pedalar, nadar, dançar. Dentro dos exercícios físicos anaeróbios estão incluídos os exercícios com pesos comumente conhecidos como musculação (SIDDIQUI; NESSA; HOSSAIN, 2010). Diferentes vias metabólicas ocorrem simultaneamente durante a prática de exercícios físicos. Para que ocorra a manutenção da contração muscular o trifosfato de adenosina (ATP) precisa ser regenerado conforme sua demanda. Três sistemas de energia funcionam para reabastecer o ATP no músculo, a via fosfogênica, a via glicolítica e a respiração mitocondrial. Os três sistemas diferem nos substratos usados, nos produtos, na taxa máxima de regeneração de ATP, na capacidade de regeneração de ATP e como contribuirão para a

fadiga. O reabastecimento de ATP durante o exercício físico é o resultado de uma resposta metabólica coordenada na qual todos os sistemas de energia contribuem para diferentes graus baseados na interação entre a intensidade e duração do exercício físico. Cada sistema é adequado para fornecer energia para um tipo de esforço físico realizado, não de forma exclusiva, mas de acordo com a demanda energética necessária para a contração muscular (BAKER; CORMICK; ROBERGS, 2010).

O exercício físico anaeróbio pode ser dividido em alático e láctico. O metabolismo anaeróbio alático utiliza como substratos energéticos ATP e fosfocreatina de forma independente do metabolismo mitocondrial e independente de oxigênio, uma via fosfogênica. A via anaeróbia láctica ocorre sem a participação direta do oxigênio, uma via dependente de glicólise. Por outro lado, no exercício físico aeróbio existe o envolvimento da fosforilação oxidativa (CHAMARI; PADULO, 2015). Ainda, o exercício físico pode ser classificado com base na sua duração em: 1) esforços explosivos (duração de até 6 s, predominância da via fosfogênica); 2) esforços de alta intensidade; (esforços compreendidos entre > 6 s a 1 min, com preponderância da via glicolítica); 3) *endurance*: esforços intensos (para exercícios físicos com duração acima de 1 min com preponderância de substratos energéticos advindos da fosforilação oxidativa) (BAKER; CORMICK; ROBERGS, 2010; CHAMARI; PADULO, 2015).

O exercício físico de *endurance*, (termo que será usado a partir deste momento neste trabalho) de longa duração ou exercício físico aeróbio envolve grandes grupos musculares em atividades dinâmicas que resultam em aumentos substanciais na frequência cardíaca e no gasto energético, proporcionando melhoras no desempenho e na aptidão física (BAKER; CORMICK; ROBERGS, 2010). Em decorrência do exercício físico de *endurance* ocorrem modificações celulares e moleculares que resultam em adaptações, como, por exemplo, um aumento no consumo de oxigênio pelos tecidos ( $VO_2$ ), um aumento na remoção de lactato sanguíneo e alterações no potencial hidrogeniônico (pH) (GAESSER; POOLE, 1996; HASKELL et al., 2007), assim esses parâmetros são frequentemente utilizados para mensurar a intensidade de exercícios físicos de *endurance*.

Já está estabelecido na literatura que o exercício físico pode fornecer benefícios a múltiplos órgãos através de vários mecanismos, incluindo melhor sensibilidade à insulina e aumento da capacidade cardiopulmonar, do fluxo sanguíneo cerebral, da oxigenação cerebral e de massa muscular e potência (VOGEL et al., 2009). As características

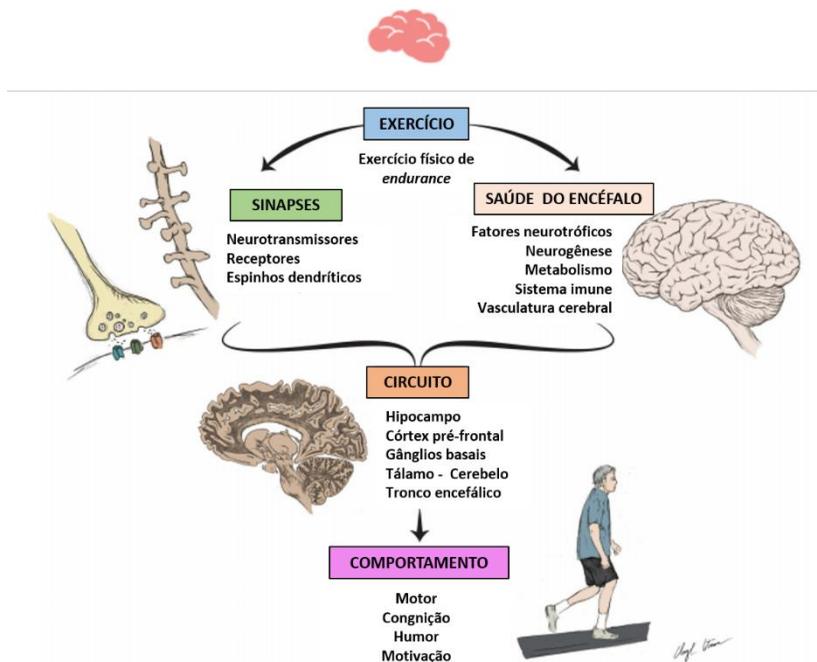
desses efeitos induzidos pelo exercício físico não são totalmente compreendidas, mas estão intimamente associadas a mudanças dependentes da atividade física dos perfis metabólicos em cada órgão, que são dependentes de moléculas que regulam a homeostase celular. Durante o exercício físico, os músculos ativos precisam de um enorme suprimento de energia, como resultado, vários órgãos se coordenam para manter um suprimento adequado de ATP e se comunicar com a musculatura esquelética. Esta contração dos músculos aumenta transitoriamente o estresse oxidativo, no entanto a contração muscular resultante da prática de exercício físico regular de maior duração (por exemplo, três vezes por semana durante 6 meses) promove a alteração do padrão molecular nos músculos esqueléticos através de mecanismos compensatórios e adaptativos que contribuem para os benefícios para a saúde (BALL, 2015). Entre os benefícios para a saúde promovidos pelo exercício físico destaca-se sua capacidade de melhorar a saúde do encéfalo, conforme mostrado na **Figura 3**.

Estudos clínicos e pré-clínicos mostram que o exercício físico aumenta a função cognitiva, melhora conexões e funções cerebrais como um todo. Dados prospectivos epidemiológicos indicam que níveis mais altos de aptidão física estão associados à redução do risco de demência (BUCHMAN et al., 2012). Uma meta-análise de 15 estudos entre indivíduos sem demência descobriu que altos níveis de atividade física reduziram o risco de declínio cognitivo em 38%, enquanto níveis baixos a moderados reduziram o risco em 35% (SOFI, et al., 2011). Os resultados de ensaios clínicos randomizados confirmam a ligação entre exercício físico regular e a saúde do cérebro, demonstrando que idosos que aderem a programas de exercícios físicos obtém melhores resultados em testes de desempenho cognitivo (BAKER et al., 2010; LIU-AMBROSE, et al., 2010). Além disso, estudos de neuroimagem mostram mudanças na estrutura e conectividade do cérebro em indivíduos que participam de programa de exercício físico, indicando maior plasticidade funcional do cérebro (BOLANDZADEH, et al., 2015; GAJEWSKI; FALKENSTEIN, 2016). Além disso, estudos com roedores comprovam os benefícios da roda de corrida voluntária no desempenho cognitivo, assim como em marcadores de neuroplasticidade em regiões do cérebro envolvidos na aprendizagem e memória, incluindo o hipocampo e o córtex pré-frontal (PRAKASH, et al., 2015, VOSS et al., 2013). Em todo o mundo, estima-se que até o ano 2030, 75,6 milhões de pessoas terão demência e esse número triplicará para 135,5 milhões até o ano 2050 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

Cabe ressaltar que indivíduos praticantes de exercícios físicos parecem ser menos predispostos ao desenvolvimento da depressão (LETT et al., 2004). Por outro lado, indivíduos diagnosticados com depressão, tem os sintomas depressivos reduzidos após serem submetidos a protocolos de exercício físico tanto *endurance*, quanto anaeróbio, ou as duas intervenções combinadas (PERRATON; KUMAR; MACHOTKA, 2009; RIMER et al., 2012). Mesmo que estes pacientes apresentem uma menor motivação para a prática de exercícios físicos (POLLOCK, 2001; STANTON; REABURN, 2013) esta estratégia é eficaz e deve ser utilizada para o tratamento dos sintomas depressivos, concomitante ou não ao uso de fármacos, pela sua eficácia, baixo custo e fácil acesso à população (RIMER et al., 2012).

A corrida (um exercício físico de *endurance*) aumenta o número de novos neurônios beneficiando as funções cognitivas, promovendo mudanças qualitativas na maturação, morfologia e conectividade neuronal (**Figura 2**). O exercício físico de corrida pode contribuir com mudanças no ciclo celular, sendo capaz de amplificar células progenitoras (FARIOLI-VECCHIOLI et al. 2014) e acelerar o nascimento e maturação neuronal no GD hipocampal (PIATTI et al. 2011; STEIB et al. 2014; ZHAO et al. 2006). Em particular estudos com marcação retroviral (VAN PRAAG et al. 2002; ZHAO et al. 2006) tem mostrado que a corrida promove a formação de espinhos dendríticos na camada molecular de células granulares em dendritos dos novos neurônios (ZHAO et al. 2014). Além disso, a mudança de espinhos dendríticos, o comprimento dendrítico total nos pontos de ramificação e a densidade de mitocôndrias são significativamente maiores em novas células neuronais no GD de camundongos (marcadas com retrovírus) após um protocolo de corrida de 3 semanas (STEIB et al. 2014; ZHAO et al. 2006). Observações parecidas podem ser verificadas no protocolo de enriquecimento ambiental (protocolo experimental contendo mudanças no ambiente físico, estímulos sensoriais auditivos, visuais, olfativos, táteis e motores) contendo roda de corrida voluntária em camundongos (GONÇALVES et al. 2016).

Figura 3. Benefícios do exercício físico de *endurance* para o encéfalo.



Legenda: O exercício físico de *endurance* melhora a saúde cerebral como um todo, promovendo aumento de fatores neurotróficos como por exemplo o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) que por sua vez participa da neurogênese hipocampal adulta e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que melhora a vascularização cerebral. O exercício físico também é capaz de melhorar a resposta imune respondendo a processos inflamatórios, além de melhorar o metabolismo como um todo. Além disso, o exercício físico promove o fortalecimento das sinapses, o balanço adequado de neurotransmissores, interação com receptores, e formação de espinhos dendríticos. Desta forma o exercício físico fortalece circuitos cerebrais que por sua vez irão melhorar o comportamento tanto motor, quando de cognição, motivação e favorecer controle do humor, podendo melhorar sintomas de ansiedade e de depressão. Adaptado de Petzinger et al. (2013).

O volume do hipocampo em adultos idosos saudáveis é aumentado por uma intervenção de exercícios físicos aeróbicos de intensidade moderada (intensidade chegando a 50-60% da frequência cardíaca máxima) por um ano (ERICKSON, et al., 2011), o que é associado a uma melhor aptidão aeróbica e aumento do volume do hipocampo (ERICKSON, et al., 2009). A melhora funcional e estrutural do cérebro promovida pelo exercício físico está intimamente ligada ao fato de que o mesmo ativa as vias de sinalização associadas à LTP, também à plasticidade sináptica e à neurogênese em estudos com animais, enquanto que em humanos, a atividade física aumenta a atividade neural e rede funcional como um todo (VOSS et al., 2013). Os mecanismos moleculares através dos quais isso ocorre não são totalmente compreendidos, no entanto, é provável que os efeitos positivos de protocolos de exercício físico sejam provocados pelo aumento da expressão de fatores neurotróficos no SNC, e também de moléculas derivadas de tecidos periféricos (SARTORI et al., 2011).

### **1.3.1 Prováveis mecanismos pelos quais o exercício físico induz a neurogênese hipocampal adulta**

O microambiente presente no nicho neurogênico da ZSG e da ZSV, pode ter fatores específicos que são permissivos para a diferenciação e incorporação de novos neurônios (ZHAO; DENG; GAGE, 2008). Células progenitoras adultas derivadas de áreas não neurogênicas exibem auto-renovação e multipotencialidade, uma vez transplantadas para uma área neurogênica do encéfalo podem se diferenciar em um contexto específico da região, sugerindo que o microambiente tem um papel importante na capacidade destas células (SHIHABUDDIN et al., 2000). A ZSG, além de progenitores neurais, possui neurônios maduros, astrócitos, oligodendrócitos e células endoteliais (RIQUELME; DRAPEAU; DOETSCH, 2008) que podem fornecer alguns dos componentes do nicho neurogênico e contribuir para a regulação da neurogênese hipocampal induzida pelo exercício físico.

Os astrócitos, o tipo celular mais abundante no cérebro dos mamíferos, fazem conexões com os neurônios por meio de sinapses tripartidas (PANATIER; ARIZONO; NAGERL, 2014). Os astrócitos também envolvem os vasos sanguíneos pelos pés astrocitários, o que faz com que os neurônios e os vasos sanguíneos trabalhem juntos como unidades funcionais (FREEMAN, 2010). Portanto, os astrócitos servem como pontes, transmitindo informações e transportando substâncias entre os vasos sanguíneos e os neurônios. Sugere-se que os astrócitos

desempenhem um papel fundamental na promoção da diferenciação neuronal do grupo de células precursoras neurais hipocampais adultos e na integração de neurônios adultos recém-nascidos (SONG; STEVENS; GAGE, 2002). Há evidências de que o exercício físico aumenta significativamente o número de astrócitos no hipocampo e em outras regiões do encéfalo (LI et al., 2005; SAUR et al., 2014) além de promover o alongamento dos prolongamentos astrócitários no hipocampo (SAUR et al., 2014). Além disso, o exercício também pode induzir mudanças plásticas nos transportadores de astrócitos, como melhorar a expressão do transportador de glicose 1 (GLUT1) para suportar a crescente demanda de glicose com o aumento da atividade neural (ALLEN; MESSIER, 2013).

A vascularização do nicho neurogênico regula o comportamento das células-tronco neurais e fornece fatores que podem regulá-la. A insuficiência vascular cerebral, como diminuição do suprimento sanguíneo ou integridade microvascular interrompida em regiões corticais podem influenciar o declínio cognitivo (FARKAS; LUITEN, 2001). Assim, as células progenitoras neurais e proliferativas presentes na ZSG estão intimamente associadas com a vascularização, indicando que fatores derivados do sangue podem ter um impacto direto sobre os progenitores neurais adultos (PALMER; WILLHOITE; GAGE, 2000). O VEGF, é um fator que regula a angiogênese e é secretado pelas células endoteliais, estando envolvido na neurogênese (JIN et al., 2002), O VEGF promove a melhora cognitiva, em parte através da sinalização do receptor do fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR2)/Flk-1, fato associado a neurogênese induzida pelo exercício físico no hipocampo (CAO et al., 2004). Por outro lado, o bloqueio periférico dos receptores de VEGF inibe a neurogênese induzida pelo exercício físico (FABEL et al., 2003).

Os nichos neurogênicos possuem muitos axônios de interneurônios locais e de regiões corticais ou subcorticais distantes (BERGAMI et al., 2015). A liberação de neurotransmissores e outros fatores por estímulos aferentes pode regular precursores em diferentes estágios das células-tronco (RIQUELME; DRAPEAU; DOETSCH, 2008). Vários neurotransmissores diferentes, como a serotonina, o GABA e o glutamato, desempenham um papel na neurogênese do hipocampo induzida pelo exercício físico. Na ZSG adulta, o GABA de interneurônios locais, tem um efeito na despolarização de neurônios granulares evento que ocorre no período inicial da neurogênese hipocampal (GE et al., 2006). A atividade mediada pelo GABA parece ser importante para a sobrevivência e maturação de células granulares

do GD através da proteína CREB (JAGASIA et al., 2009). Sugere-se que o fator de transcrição CREB seja ativado por BDNF liberado pelo exercício físico promovendo sobrevivência celular pela ativação da sinalização mediada pela Akt (CHEN; RUSSO-NEUSTADT, 2009). A serotonina também tem um papel importante na neurogênese induzida pelo exercício físico uma vez que a estimulação do receptor 5-HT<sub>3</sub> promove a neurogênese, sendo que a deficiência da subunidade do receptor 5-HT<sub>3</sub> resulta na inibição de neurogênese hipocampal induzida pelo exercício físico (KONDO et al, 2014).

Um tipo de receptor glutamatérgico, o N-metil-D-aspartato (NMDA) está envolvido na LTP induzida pelo exercício físico (FARMER et al., 2004). O exercício aumenta os níveis de RNAm de NR2B, uma subunidade do receptor de NMDA ao mesmo tempo que aumenta expressão de BDNF no GD, indicando que a elevação da liberação de glutamato e de BDNF por neurônios locais ou neurônios externos ao nicho neurogênico pode contribuir para a regulação positiva do exercício físico na neurogênese hipocampal adulta (FARMER et al., 2004). Contudo, nenhum destes aspectos isoladamente é capaz de explicar como o exercício físico age na neurogênese, pois provavelmente um conjunto de eventos desencadeie este efeito.

### **1.3.2 Exercício físico na depressão: O papel do BDNF**

Estudos pré-clínicos buscam elucidar as vias de sinalização intracelular envolvidas no efeito tipo-antidepressivo advindo da prática de exercícios físicos. Estes efeitos parecem ocorrer principalmente devido a um aumento das neurotrofinas (SARTORI et al., 2011). As neurotrofinas são uma família de fatores de crescimento secretados que regulam a sobrevivência, proliferação e diferenciação e a manutenção dos neurônios tanto no SNC quanto no sistema nervoso periférico, e tem uma infinidade de funções celulares, como metabolismo de glicose e lipídeos, balanço energético, síntese de proteínas, dentre outras (CHALDAKOV, 2011; HUANG; REICHARDT, 2001; LEWIN; BARDE, 1996). O BDNF, a neurotrofina mais amplamente expressa no cérebro, é sintetizado em áreas com funções cognitivas como o hipocampo e pode ser transportado retrogradamente para regiões distantes do cérebro (MAROSI; MATTSON, 2014; SALEHI et al., 2006). As vias de sinalização intracelular favorecem o aumento desta família de fatores de crescimento que regulam uma variedade de funções neuronais, incluindo proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação (SALEHI; DELCROIX; MOBLEY, 2003).

O mecanismo de ação do BDNF envolve a ativação dos receptores TrkB e promove a fosforilação e ativação da enzima fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K), com a consequente fosforilação da Akt, e assim parece inibir a atividade da enzima cinase da glicogênio sintase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) e ativar a proteína alvo mecanístico da rapamicina (mTOR) (BRUEL-JUNGERMAN et al., 2009; CHEN; RUSSO-NEUSTADT, 2005). Quando o pró-BDNF é transcrito, esse sofre clivagem proteolítica gerando a forma madura do BDNF (MOWLA et al., 2001). O BDNF maduro parece ligar-se preferencialmente ao receptor TrkB provocando uma cascata de sinalização intracelular que promove a sobrevivência celular e plasticidade neuronal, enquanto o pró-BDNF tem elevada afinidade para o receptor p75 provocando apoptose e morte neuronal (LU; PANG; WOO, 2005). A clivagem extracelular de pró-BDNF ocorre por duas moléculas principais: 1) a protease ativador de plasminogênio tecidual (tPA) que converte plasminogênio em plasmina, que, por sua vez, cliva o pró-BDNF gerando BDNF maduro (PANG et al., 2004; LU; PANG; WOO, 2005); 2) o p11, também chamado S100A10, encontrado no citosol ou na superfície interna da membrana plasmática pode estar presente também na superfície extracelular, onde ancora o tPA (SVENNINGSSON et al., 2006). O exercício físico de roda de corrida aumenta os níveis de BDNF, tPA e de p11, sugerindo uma maior conversão de pró-BDNF em BDNF maduro (SARTÓRI et al 2011). Além disso, o aumento de p11 e pró-BDNF parece estar relacionado com efeito antidepressivo ( TSAI, 2006, TSAI, 2005; WARNER-SCHMIDT, 2010).

Estudos apontam que o exercício físico de *endurance* promove aumentos de BDNF no SNC especificamente em regiões límbicas, como o hipocampo (FANG et al., 2013; SCHMIDT; DUMAN, 2007), tanto em roedores quanto em humanos (CHEN; RUSSO-NEUSTADT, 2005; SARTORI et al., 2011), mediando efeitos como a neurogênese hipocampal (ROSSI et al., 2006). O aumento do BDNF também ocorre com o exercício físico voluntário, e é melhorado quando combinado ao tratamento com o fármaco fluoxetina (um inibidor seletivo da receptação de serotonina) (ENGESSER-CESAR; ANDERSON; COTMAN, 2007). Acrescenta-se que o BDNF pode sofrer uma regulação negativa em resposta ao exercício físico de *endurance* em níveis séricos (KROGH et al., 2014), em fibras musculares (CUPPINI et al., 2007; MATTHEWS et al., 2009; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012), células satélites, células de Schwann e células endoteliais que circundam as células musculares (LIEM; BROUWER; COPRAY, 2001).

Quando liberado na periferia o BDNF é capaz de atravessar a

barreira hematoencefálica (BHE) bi-direcionalmente (PAN et al., 1998), também pode ser sintetizado pelo músculo esquelético e utilizado na junção neuromuscular, no entanto a maioria do BDNF produzido periféricamente é liberado na circulação, podendo ser internalizado e armazenado em plaquetas (FUJIMURA et al., 2002; MATTHEWS et al., 2009; MOUSAVI; JASMIN, 2006). Um estudo de Rasmussen e colaboradores (2009) mostra que durante o exercício físico cerca de 70-80% do BDNF circulante é proveniente do cérebro e o restante derivado de fontes periféricas, por exemplo, plaquetas, células T, células B e monócitos (RASMUSSEN et al., 2009). Acrescenta-se que os níveis de BDNF séricos e centrais podem sofrer uma regulação positiva em resposta a protocolos de exercício físico (KROGH et al., 2014; SEIFERT et al. 2010). De fato, estudos clínicos e pré-clínicos confirmam que o exercício físico de *endurance* aumenta o BDNF no SNC, especificamente, no hipocampo (CHEN; RUSSO-NEUSTADT, 2005; FANG et al., 2013; HUANG et al., 2013; SARTORI et al., 2011; SEIFERT et al., 2010; SCHMIDT; DUMAN, 2007) e está intimamente relacionado com neurogênese hipocampal promovida pelo exercício físico (ROSSI et al., 2006).

Conforme já mencionado, o GD hipocampal é uma das regiões mais vulneráveis ao envelhecimento e neurodegeneração, e por este motivo, a prática de exercícios físicos se constitui em uma estratégia neuroprotetora importante por estimular a neurogênese na idade adulta. Neste sentido, especula-se que este processo envolva moléculas liberadas pelos músculos periféricos durante o exercício.

### 1.3.3 Exercício físico e miocinas

O termo miocinas foi a denominação dada a moléculas sintetizadas e liberadas pelo músculo estriado esquelético, como por exemplo citocinas e peptídeos, que exercem efeitos autócrinos, parácrinos e/ou endócrinos (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012; PEDERSEN, 2013). As miocinas podem ser consideradas mediadoras dos efeitos benéficos de protocolos de exercício físico em resposta à contração muscular (SCHNYDER; HANDSCHIN, 2015), possuindo ação em órgãos como fígado, intestino e cérebro, além do tecido adiposo. As miocinas contribuem para a regulação autócrina do metabolismo no próprio músculo e para a regulação parácrina/endócrina de outros órgãos próximos ou distantes. Portanto, as miocinas são fatores com potencial significativo para regular o metabolismo de todo o corpo, bem como para manter as propriedades funcionais e estruturais

dos músculos (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2013). Um modelo *in vitro* de estimulação elétrica por pulso de miotubos que mimetiza a contração muscular (EVERS-VAN GOGH, et al., 2015) ou *in vivo* pós-exercício físico de amostras musculares (ou seja, plasma ou biópsia muscular), mostra a presença de várias miocinas que foram descobertas e testadas quanto aos seus efeitos metabólicos (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012).

Miocinas induzidas por contração muscular provavelmente regulam o metabolismo energético e a resposta neurobiológica através de sua função endócrina e na adaptação do músculo esquelético através de mecanismos que ainda não foram elucidados. Para ser considerada uma miocina a proteína proposta deve preencher os seguintes critérios: deve ser liberada (transitória ou continuamente) dos músculos esqueléticos; deve exercer uma função biológica de maneira autócrina, parácrina ou endócrina (KIM et al., 2019). Entre as miocinas destacam-se o BDNF (MATTHEWS et al., 2009) e a irisina (BOSTRÖM et al., 2012).

Dentro das adaptações do músculo esquelético em resposta ao exercício físico de *endurance* evidencia-se o padrão de disparo dos motoneurônios ou neurônios motores. A contração muscular (deslizamento da proteína actina sobre a miosina) ocorre através da liberação de uma pequena quantidade de cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático para o citosol e posterior ativação de vias de sinalização intracelular. Estas vias são mediadas pela fosfatase calcineurina e por algumas proteínas da família das cinases, como a cálcio/calmodulina cinase 2 (CaMK-2). Assim, elas alteram o estado de fosforilação de múltiplos fatores de transcrição e seus coativadores, como por exemplo, o coativador do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PGC-1 $\alpha$ ) (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008). O PGC-1 $\alpha$  é altamente versátil e responsável por muitas das adaptações oxidativas em resposta ao exercício físico de *endurance* (HAWLEY et al., 2014). Além disso, o PGC-1 $\alpha$  pode ligar-se ao PPAR- $\gamma$  e facilitar sua interação com fatores de transcrição, como a proteína CREB, e assim pode controlar o metabolismo e síntese de diversas proteínas, como fatores tróficos e miocinas (LOUET et al., 2002).

A expressão de PGC1- $\alpha$  é induzida no músculo estriado esquelético em resposta ao exercício físico aeróbio tanto em roedores, quanto em humanos (GOTO et al., 2000; PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003) e rege a transcrição do FNDC5 (fibronectina tipo III contendo o domínio 5), expresso no músculo esquelético, coração e cérebro (HUH et al., 2014; TEUFEL et al., 2002; WRANN et al., 2013). Em 2002, dois grupos clonaram independentemente um novo gene

denominado PeP ou, alternativamente Frp2, que continha um domínio de fibronectina III (FNIII) hoje chamado de FNDC5 (FERRER-MARTINEZ et al., 2002; TEUFEL et al., 2002). Posteriormente o FNDC5 foi considerado uma miocina dependente de PGC-1 $\alpha$  que é secretada do músculo durante o exercício físico e induz alguns dos principais benefícios metabólicos do exercício físico (BOSTRÖM et al., 2012). O FNDC5 é um receptor transmembrana, possui 209 resíduos de aminoácidos em camundongos e 212 em humanos, contém um domínio correspondente a FNIII, um domínio transmembrana hidrofóbico e um carboxi-terminal e o segmento citoplasmático com 39 resíduos de aminoácidos (SCHUMACHER et al., 2013). Através da clivagem da proteína, glicosilação e provável dimerização do FNDC5, ocorre a liberação de uma molécula que consiste na maior parte do domínio da FNIII. Esta proteína, que possui 112 resíduos de aminoácidos foi denominada irisina (BOSTRÖM et al., 2012). No ano de 2013, a irisina foi finalmente cristalizada e sua estrutura foi relatada no estudo de Schumacher e colaboradores. Neste estudo, o domínio do tipo FNIII mostra uma confirmação incomum, com um dímero de folha  $\beta$  inter-subunidade contínua, que não tinha sido previamente descrito para qualquer outra proteína FNIII estudada, assim, a existência da irisina (recombinante bacteriano) foi confirmada como um homodímero (SCHUMACHER et al. 2013).

#### 1.4 IRISINA

A irisina recebeu este nome em referência a deusa Íris, a mensageira dos deuses na mitologia grega. Após sua síntese, esta proteína é liberada e se difunde na corrente sanguínea alcançando órgãos como tecido adiposo e encéfalo (BOSTRÖM et al., 2012). Foi originalmente descrita por promover uma conversão do tecido adiposo branco para o fenótipo marrom, e como um subproduto advindo da prática de exercícios físicos, e desde então gerou grande interesse na comunidade científica, como uma molécula relacionada com tratamento da obesidade e do diabetes tipo II (BOSTRÖM et al., 2012; LEE et al., 2014; RANA et al., 2014; ZHANG et al., 2013). No estudo original desenvolvido por Boström et al. (2012) constatou-se a regulação positiva da expressão do gene FNDC5 no músculo esquelético, bem como o aumento dos níveis séricos de irisina após exercícios físicos de *endurance* em ratos e em humanos. O aumento dos níveis circulantes de irisina pela superexpressão de FNDC5 de vetores adenovirais no fígado levou a um aumento do tecido adiposo marrom, ou seja, houve uma

regulação positiva da expressão da proteína desacopladora 1 (UCP1) e um aumento da tolerância à glicose em camundongos (BOSTRÖM et al., 2012). Ambos estão entre os principais benefícios metabólicos do exercício físico de *endurance*.

Atualmente, muitos estudos investigam o papel do FNDC5/irisina no exercício físico, incluindo estudos pré-clínicos com roedores e ensaios clínicos em humanos. A indução do RNAm de FNDC5 no músculo esquelético pelo exercício físico de *endurance* foi confirmada em estudos, tanto em camundongos (QUINN et al. 2015; TIANO et al., 2015; WRANN et al., 2013) quanto em humanos (ALBRECHT et al., 2015; LECKER et al., 2012; NORHEIM et al. 2014) usando a reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-PCR) ou sequenciamento de RNA. Como em todos os estudos clínicos, há muitas variáveis a serem consideradas, como estudos retrospectivos versus experimentos com intervenção, idade e nível de condicionamento físico dos indivíduos e, mais importante, o tipo de protocolo de exercícios físicos utilizado e o momento da coleta da amostra (horas após a última sessão de treino).

O potencial anti-inflamatório, antioxidante e anti-apoptótico da irisina começou a ser estudado recentemente. A irisina pode induzir ações antiapoptóticas, regulando negativamente caspases, inibindo a translocação do BAD do citosol para a mitocôndria e reduzindo a formação de BAX. Além disso, seus efeitos antiapoptóticos dependentes de caspases envolvem uma regulação negativa da caspase-3, 8, 9, BAX e uma regulação positiva de Bcl-2. A irisina também parece impedir o estresse oxidativo por modular a via de sinalização 5' proteína cinase ativada por AMP (AMPK), PI3K, Akt, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS). Suas propriedades anti-inflamatórias incluem redução da secreção de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), e o recrutamento de células inflamatórias, como as células T e os linfócitos. Especula-se um potencial terapêutico da terapia com irisina exógena contra patologias envolvendo inflamação, estresse oxidativo e apoptose, no entanto existe uma lacuna muito grande entre evidências e o real efeito da irisina neste contexto (ASKARI et al., 2018). Maiores níveis de massa muscular estão associados positivamente à irisina circulante, além disso, taxas de glicose, grelina e fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), estão associados a altos níveis de irisina circulante. Entretanto, no envelhecimento, níveis de insulina e adiponectina altos estão associados a baixos níveis circulantes de irisina (HUH et al., 2012; LIU et al., 2013; STENGEL et al., 2013).

A irisina já foi descrita em outros tecidos como os neurônios cerebelares de Purkinje envolvidos em mecanismos simpáticos e termogênese (DUN et al., 2013). No hipotálamo, a irisina foi encontrada em neurônios paraventriculares, co-localizada com o peptídeo Y, também há relatos de sua presença no fluido cerebrospinal, sugerindo que a irisina pode exercer um controle no metabolismo central, além do periférico. Destaca-se ainda sua presença no sangue, terminações nervosas, neurônios e células gliais (AYDIN et al., 2014; BOSTRÖM et al., 2012; DUN et al., 2013; GUR et al., 2017; PIYA et al., 2014).

A irisina é altamente conservada em mamíferos sendo descrita como 100% idêntica em camundongos e humanos (BOSTROM et al. 2012). Um grau tão alto de conservação é frequentemente o resultado da pressão evolucionária para conservar a função. Curiosamente, o FNDC5 humano tem um início de tradução atípico, tendo o códon ATA no lugar de ATG, comparado ao FNDC5 de camundongo. Assim, a existência de irisina chegou a ser questionada afirmando que os kits comerciais utilizados para sua detecção carecem de especificidade, os resultados de *western blotting* poderiam estar sinalizando falsamente a proteína, os níveis no soro estariam aparentemente abaixo dos níveis de detecção (ATHERTON; PHILIPS, 2013). Para identificar e quantificar a irisina no plasma humano, Jedrychowski e colaboradores (2015) usaram espectrometria de massa. A irisina humana foi descrita principalmente a partir do seu códon de início não canônico ATA, assim os autores afirmam inequivocamente que a irisina humana existe. O experimento foi realizado em homens jovens com idade entre 25 a 30 anos, realizou-se durante 12 semanas, o treinamento foi aeróbico de alta intensidade realizado 3 dias por semana de intervalos em um ciclo ergômetro separados por 2 dias por semana de caminhada em esteira. Os níveis séricos são de aproximadamente 3.6 ng/ml em indivíduos sedentários e foram aumentados em resposta ao treinamento aeróbio intervalado para aproximadamente 4.3 ng/ml (JEDRYCHOWSKI et al., 2015). Ainda, parece existir uma correlação linear entre os níveis séricos de irisina e os níveis encontrados no fluido cerebrospinal sugerindo que a irisina ali encontrada é originada da periferia atravessando a BHE (PIYA et al., 2014).

Recentemente os efeitos benéficos do exercício físico no SNC estão sendo relacionados com a irisina. Ela é capaz de atravessar a BHE e exercer efeito em estruturas límbicas, como o hipocampo onde desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que culmina com a transcrição e tradução de BDNF (WRANN et al., 2013). Moon e colaboradores (2013) realizaram um estudo *in vitro* mostrando que a

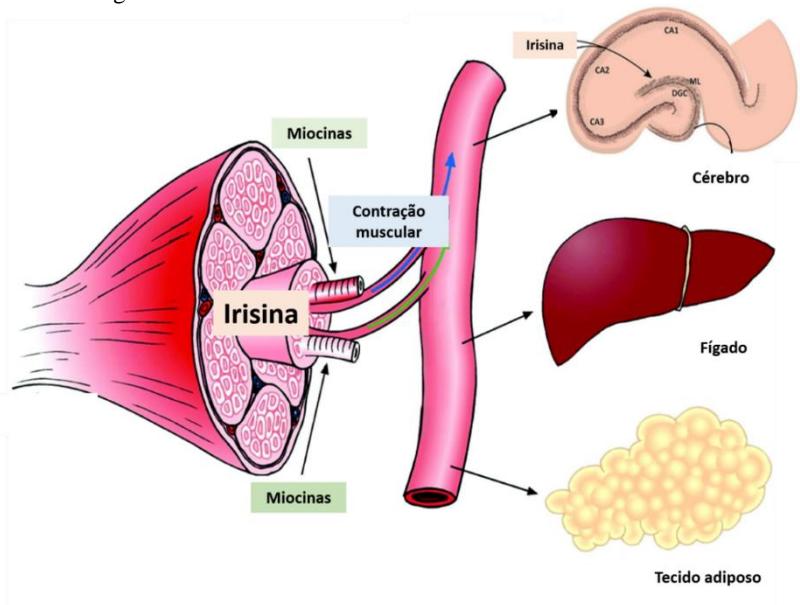
irisina favorece a neurogênese e a sinaptogênese, de forma dose dependente (MOON; DINCER; MANTZOROS, 2013). Cabe ressaltar, que foi relatado que os níveis plasmáticos de irisina e BDNF estão positivamente correlacionados com a função cognitiva em atletas de resistência (BELVIRANLI et al. 2016).

Em precursores neurais, o silenciamento gênico *knockdown* de FNDC5 prejudica o desenvolvimento de neurônios maduros e astrócitos, sugerindo um papel no desenvolvimento (HASHEMI et al., 2013). Por outro lado, a superexpressão de FNDC5 durante a formação de precursores neuronais a partir de células-tronco embrionárias de camundongo aumentou os marcadores neuronais maduros (Map2,  $\beta$ -tubulinIII e Neurocan) e marcador de astrócitos (GFAP) e BDNF. No entanto, a superexpressão de FNDC5 em células-tronco embrionárias de camundongos indiferenciadas não tem esses efeitos, indicando que o FNDC5 estimula a diferenciação neural em vez de comprometer esta linhagem (FOROUZANFAR et al., 2015). A irisina recombinante é capaz de aumentar a proliferação celular na linhagem de células hipocâmpais de camundongos H19-7 (MOON et al., 2013). Além disso, a superexpressão de FNDC5 aumenta a sobrevivência celular em neurônios corticais, enquanto o *knockdown* do FNDC5 tem o efeito oposto em cultura de células (WRANN et al., 2013). Em modelos animais a irisina tem sido associada a efeitos neuroprotetores em patologias como Alzheimer, isquemia cerebral e transtornos de humor como a depressão (LI et al., 2017; XIA et al., 2017; WANG; PAN, 2016).

Um estudo de Wrann e colaboradores (2013) observaram que a entrega de FNDC5 no fígado através de vetores virais resulta em elevação dos níveis séricos de irisina e induz a expressão de BDNF no hipocampo de camundongos. Quando os camundongos foram submetidos a um protocolo de exercício físico aeróbio foi observado um aumento de FNDC5 no hipocampo, porém o mesmo efeito não foi observado no córtex total (WRANN et al., 2013). Cabe ressaltar que o polimorfismo genético do BDNF (BDNF<sup>Met/Met</sup>) em ratos inibe a capacidade do exercício físico de promover efeitos tipo-antidepressivos, também previne o aumento da neurogênese além de inibir os níveis de RNAm de BDNF e FNDC5 no GD do hipocampo (IERACI et al., 2016). Um estudo de Cunha e colaboradores (2018) mostrou que o tratamento com creatina reduz o comportamento tipo-depressivo de camundongos ao mesmo tempo que aumenta os níveis hipocâmpais de RNAm de PGC1 $\alpha$  / FNDC5/ BDNF (CUNHA et al., 2018).

Zhang e colaboradores (2015b) analisaram a atividade locomotora de camundongos após a administração aguda de irisina e o desfecho é que quando esta proteína foi injetada pela via intracerebroventricular (i.c.v.) ocorreu um aumento rápido e transitório na atividade locomotora e metabólica, entretanto quando foi administrada periféricamente não causou efeito na atividade locomotora. Além disso, a irisina injetada centralmente também induziu um aumento significativo no consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono e produção de calor, indicando um aumento na atividade metabólica possivelmente através da ativação do sistema nervoso simpático. (ZHANG et al., 2015b). Em ratos, a administração de irisina por via intravenosa ou mesmo diretamente no terceiro ventrículo foi capaz de aumentar a pressão arterial e a contratilidade cardíaca. A administração central desta proteína ativou neurônios nos núcleos paraventriculares do hipotálamo pelo aumento da imunorreatividade de c-fos. A administração central de irisina também aumentou a pressão arterial e a contratilidade cardíaca. Em contraste, a injeção i.c.v. de irisina reduziu a pressão sanguínea tanto em animais controle como aqueles com hipertensão espontânea (ZHANG et al., 2015c).

Figura 4. Irisina resultante da contração muscular e seu efeito após liberada na corrente sanguínea.



Legenda: Após a prática de exercícios físicos o músculo libera na corrente sanguínea uma série de miocinas, entre elas a irisina. Estas miocinas atingem órgãos como o fígado, tecido adiposo e, de especial interesse, o encéfalo. Acredita-se que a irisina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e tem ação no hipocampo. Imagem adaptada de Phillips et al., 2014; Kelly, 2012.

A literatura reporta dois estudos referentes à relação entre irisina e depressão. O primeiro, um estudo clínico que avaliou pacientes obesas e mensurou os níveis séricos de irisina, não encontrou associação entre os níveis desta proteína e escalas de depressão, estresse ou ansiedade (HOFMANN et al., 2016). O segundo, um estudo pré-clínico, analisou o comportamento tipo-depressivo de ratos submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível (CUS), constatando que a administração de irisina nestes animais foi capaz de regular o metabolismo energético (atividade mitocondrial, creatina quinase, níveis de glicose e ATP) no córtex pré-frontal, além de melhorar aspectos comportamentais aumentando a preferência por sacarose e reduzindo o tempo de imobilidade no teste do nado forçado (WANG; PAN, 2016). Diante deste contexto, a presente tese está constituída por II Capítulos. No I

Capítulo foi analisado o possível efeito tipo-antidepressivo da irisina. No II Capítulo buscamos elucidar a presença da irisina e marcadores pró-neurogênicos após um protocolo de exercícios físicos.

## 2 JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2017), a depressão é a principal causa de incapacitação a nível global, com o agravante de anualmente ser a primeira responsável por causar de mortes decorrentes do suicídio (WHO, 2017). A depressão causa diversas consequências socioeconômicas, como perda da produtividade, qualidade de vida e comprometimento no relacionamento social, sendo um transtorno de humor crônico e recorrente, heterogêneo e de causas multifatoriais (DSM-V, 2013; SHELINE et al., 2013).

A baixa adesão dos pacientes à terapêutica convencional e os efeitos adversos causados pelo uso dos medicamentos levam a necessidade de se buscar ferramentas que contribuam com a terapia antidepressiva. O exercício físico destaca-se por ser uma alternativa não-farmacológica que pode ser utilizada juntamente ao tratamento antidepressivo. Embora o efeito positivo do exercício físico na depressão tenha sido extensivamente relatado, os mecanismos neuroplásticos e bioquímicos responsáveis por tais efeitos benéficos não estão completamente esclarecidos.

Considerando que as alterações observadas na fisiopatologia da depressão parecem ser atenuadas pelo exercício físico (LINDWALL et al., 2007; ERICKSON; MILLER; ROECKLEIN, 2011) e que o músculo esquelético sintetiza e libera miocinas que exercem efeitos neuroplásticos (WRANN et al., 2013; XU, 2013; PHILLIPS et al., 2014), o objetivo do presente estudo é elucidar a relação entre a miocina irisina e o comportamento tipo-antidepressivo induzido pelo exercício físico em camundongos e os mecanismos subjacentes a este efeito.



### **3 CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DO POSSÍVEL EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DA IRISINA**

Estudos sugerem que a irisina é uma das moléculas responsáveis pelos efeitos benéficos do exercício físico no cérebro (LI et al., 2017; WANG; PAN, 2016; WRANN, 2013). O FNDC5 e a irisina estão associados à neuroplasticidade, sendo capazes de modular a proliferação neuronal (MOON et al., 2013), diferenciação, conferir neuroproteção ao peptídeo amiloide 1-42 ( $A\beta_{1-42}$ ) em camundongos (XIA et al., 2017; LOURENÇO, 2019), e promover o efeito tipo-antidepressivo em ratos submetidos ao protocolo de CUS (WANG; PAN, 2016). Além disso, existe uma correlação bem estabelecida na literatura entre o aumento dos níveis de BDNF no cérebro e a prática de exercícios físicos (CHEN; RUSSO-NEUSTARDT, 2009; FANG et al., 2013; SARTORI et al., 2011; SEIFERT et al., 2010), fato recentemente associado a liberação de irisina, sugerindo uma via de sinalização dependente de  $PGC1\alpha$ /FNDC5/BDNF (WRANN et al., 2013). Sendo assim, o objetivo deste primeiro Capítulo foi analisar o efeito da irisina e do BDNF em testes preditivos de ação-antidepressiva, além de avaliar a expressão gênica de  $PGC1-\alpha$ , FNDC5 e BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo, duas regiões cerebrais intimamente correlacionadas com a depressão (SCHMAAL et al., 2016).

#### **3.1 OBJETIVOS**

##### **3.1.1 Objetivo geral**

Investigar o possível efeito tipo-antidepressivo da administração central de irisina e BDNF em camundongos.

##### **3.1.2 Objetivos específicos**

- Analisar o perfil comportamental de camundongos em testes preditivos de ação antidepressiva: teste do nado forçado (TNF) e teste de suspensão pela cauda (TSC). Além do teste do campo aberto (TCA) para avaliação da atividade locomotora e parâmetros de ansiedade, uma hora após a administração central de três diferentes doses irisina.

- Avaliar o efeito da administração central de irisina ao longo de diferentes tempos sobre a resposta comportamental de camundongos no TSC e TCA.

▪Examinar o efeito da administração central de irisina em dois diferentes tempos (1 e 6 h) sobre os genes PGC-1 $\alpha$ , FNDC5 e BDNF, no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

▪Quantificar os níveis de BDNF após a administração central de irisina em dois diferentes tempos (1 e 6 h) no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

▪Avaliar o efeito da administração central de BDNF em dois diferentes tempos (1 e 6 h) sobre os testes TSC e TCA em camundongos.

▪Examinar o efeito da administração central de BDNF em dois diferentes tempos (1 e 6 h) sobre os genes PGC-1 $\alpha$ , FNDC5 e BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

▪Quantificar os níveis de BDNF após a administração central de BDNF em dois diferentes tempos (1 e 6 h), no córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Animais

Nesta primeira etapa do trabalho foram utilizados camundongos C57BL/6 machos pesando entre 25–35 g, 60–70 dias de vida, sujeitos às condições padrão de acondicionamento, temperatura (21 $\pm$ 1 °C) e ciclo claro-escuro 12/12 horas. Todos os esforços foram feitos para minimizar e reduzir o número de animais, e os procedimentos realizados tiveram a anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais da instituição (CEUA/UFSC – PP00795). Os camundongos foram mantidos em caixas de polipropileno (40x32x17 cm) contendo 12 animais por caixa. Eles tiveram livre acesso à ração comercial para camundongos NUVITAL - Nuvilab CR1 e água potável filtrada. Antes da realização dos testes comportamentais os animais foram aclimatados por no mínimo duas horas. Os aparatos dos testes comportamentais foram limpos após cada teste com álcool 10%.

### 3.2.2 Testes comportamentais

#### 3.2.2.1 Teste do nado forçado (TNF)

O TNF baseia-se na observação dos animais submetidos a uma situação de desespero comportamental este modelo foi proposto por Porsolt e colaboradores (1977). Os camundongos são colocados em um cilindro com 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura, sendo que a coluna de água ocupava 19 cm deste recipiente, à temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . O teste teve duração de seis minutos, sendo que os camundongos foram submetidos a uma única sessão, na qual foram colocados em um cilindro plástico e foi analisado o tempo de imobilidade (PORSOLT; BERTIN; JALFRE (1977).

#### 3.2.2.2 Teste da suspensão pela cauda (TSC)

O comportamento dos animais no TSC foi avaliado conforme método desenvolvido por Steru e colaboradores (1985). Para realização do teste, os camundongos foram isolados visualmente e suspensos pela cauda 50 cm acima do chão por fita adesiva. O tempo de imobilidade foi registrado por um período de seis minutos (STERU et al., 1985).

#### 3.2.2.3 Teste do campo aberto (TCA)

O TCA foi descrito por Hall (1936), e foi realizado com o intuito de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TNF ou no TSC seja devido a uma estimulação da atividade locomotora. O aparato consiste em uma caixa de madeira 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrados iguais. Os camundongos foram avaliados com relação ao número de quadrados cruzados por um período de seis minutos. O TCA foi realizado 10 minutos após a realização do TSC (HALL, 1936).

#### 3.2.2.4 Administração intracerebroventricular (i.c.v.)

A administração i.c.v. de irisin ou BDNF foi realizada pela técnica à mão livre (CUNHA et al., 2015; LAURSEN; BELKNAP, 1986). Uma agulha hipodérmica com 0,4 mm de diâmetro externo, conectada por uma cânula de propileno a uma seringa Hamilton de 25  $\mu\text{L}$ , foi inserida perpendicularmente através do crânio, não mais de 2 mm para o interior do cérebro de cada camundongo, diretamente no

ventrículo lateral. Os camundongos foram previamente anestesiados com isoflurano, durante aproximadamente 15s, tempo necessário para ocorrer a perda do reflexo postural. A assepsia do local da injeção foi realizada utilizando uma gaze com etanol a 70%. A agulha foi inserida unilateralmente 1 mm para a direita ou a esquerda do ponto médio de uma linha traçada até a base anterior das orelhas (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade). Um volume de 3  $\mu$ L da droga foi injetado diretamente no ventrículo lateral. A injeção foi administrada durante 30s e a agulha permaneceu no local por mais 30s, a fim de evitar o refluxo da substância injetada. Para os testes comportamentais, a irisina (human recombinant Caymam, MI, USA) foi administrada nas doses de 0, 1, 0,5 e 1 ng/camundongo (dose escolhida a partir de um teste piloto realizado no laboratório). O grupo controle recebeu NaCl 0,9%. Uma hora após a administração foram realizados os testes comportamentais e todos os testes foram filmados para melhor análise. Para a curva tempo-resposta o TSC foi realizado 30 minutos, 1, 6 e 24 horas após a administração i.c.v. seguidos do TCA. Também realizamos testes utilizando o BDNF (human recombinant Prospec, NJ, USA), este foi administrado na dose de 0,25  $\mu$ g/camundongo (doses escolhidas com base na literatura SIRIANNI et al., 2010; VALVASSORI et al., 2015). via i.c.v. e a resposta comportamental foi avaliada no TSC seguido do TCA, 1 e 6 horas após a injeção.

### **3.2.3 Testes bioquímicos**

#### **3.2.3.1 Extração de RNA, cDNA e Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qRT-PCR)**

O hipocampo e o córtex pré-frontal foram coletados e imediatamente congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . O RNA total foi extraído com o regente Trizol (Invitrogen, USA) e as amostras foram tratadas com DNase I, (Amplification Grade Invitrogen, USA), por remoção do DNA genômico. O RNA total foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso. A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada com 0,4  $\mu$ g de cada tecido de RNA e o transcrito reverso para o cDNA usando o kit adequando (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Invitrogen, CA, USA). A mistura da reação foi incubada a  $25^{\circ}\text{C}$  por 10 min em um volume final de 20  $\mu$ l, a  $48^{\circ}\text{C}$  por 1 h, e após a  $95^{\circ}\text{C}$  por 5 min. O cDNA obtido foi diluído em uma solução 1:5. O qRT-PCR foi realizado usando 0.3 mM para cada primer, e 5  $\mu$ l de Maxima SYBR®

Green/ROX qPCR Master Mix 2× (Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil). Também foi inserido 2 µl para cada diluição de cDNA, em 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). As condições de amplificação foram 50°C por 2 min, 90°C por 10 min seguidas por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 min. Os primers usados foram desenhados com Primer Express software versão 3.0 (Applied Biosystems, USA) e as sequências foram: BDNF *forward* (CATAGACAAAAGGCACTGGAAGTC) e reverso (TAAGGGCCCGAACATACGAT); FNDC5 *forward* (GGCTGGGAGTTCATGTGGAA) e reverso (TGGGAAGCGTTATCTTTGCT), PGC1- $\alpha$  *forward* (ATGTGACTGGGGACTGTAGTAAGA) e reverso (GCAGCACACTCTATGTCACTC),  $\beta$ -actina *forward* (AAATCGTGCGTGACATCAAAGA) e reverso (GCCATCTCCTGCTCGAAGTC). Os resultados foram analisados pelo software Sequence Detection Systems (SDS) versão 2.4 (Applied Biosystems, CA, USA). A eficiência dos primers foi testada usando uma curva padrão. Com este propósito uma diluição seriada foi realizada (1:3, 1:7, 1:15, 1:31, 1:63) a partir de uma única amostra de cDNA constituída por um pool de todos os cDNAs dos diferentes tratamentos. Somente os primers que mostraram eficiência entre -2.9 e -3.3 foram usados. Especificamente o produto do qPCR foi analisado por uma curva de dissociação realizada após a amplificação, observando-se um pico único na T<sub>m</sub> esperada. Além disso, a estabilidade do gene de controle foi verificada pela ferramenta online RefFinder. Os resultados foram analisados pelo método baseado na curva padrão (LARIONOV et al., 2005), no qual foram dados números arbitrários para cada um dos cinco pontos em uma escala logarítmica de base 10. Os controles foram confrontados com as curvas, resultando em um valor relativo de amplificação. Os resultados foram normalizados pelos valores de  $\beta$ -actina e convertidos em porcentagem considerando os valores de controle como 100%.

### 3.2.3.2 Dosagem de BDNF

Os níveis de BDNF foram mensurados pelo método de ELISA usando o BDNF Emax Immuno Assay System kit (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as orientações do fabricante. Uma placa de 96 poços foi incubada com o anticorpo monoclonal anti-BDNF em tampão de carbonato (pH = 9,7) durante a noite à 4°C. A placa foi lavada com PBS-Tween-20 (PBST; 8 mM tampão fosfato salina, 240 mM NaCl,

0,05% Tween-20) e bloqueada por 1 hora em temperatura ambiente. A curva padrão foi realizada com uma solução padrão de BDNF. As amostras de tecido foram diluídas em tampão de bloqueio (Promega, Madison, WI, USA) e subsequentemente adicionadas aos poços restantes (100 µl por poço). As placas foram incubadas durante 2 horas sob agitação a 25°C. Subsequentemente, as microplacas foram lavadas cinco vezes com PBST e foi adicionado um anticorpo policlonal anti BDNF humano incubado durante 2 h à temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBST, foi adicionado um anticorpo secundário anti-IGY conjugado com peroxidase (a placa que foi incubada durante mais 1 h à temperatura ambiente. Após cinco lavagens com PBST, um substrato com peroxidase foi adicionado por 15 min. A reação foi interrompida adicionando uma solução contendo 1 N HCl e a absorbância foi observada em um leitor de microplacas (Multireader Infinite M200 TECAN) a 450 nm. Os níveis de BDNF (expressos como pg/mg proteína) foram calculados com curva padrão preparada para cada placa.

#### **3.2.4 Análise estatística**

O teste de Kolmogorov–Smirnov foi usado para avaliar a normalidade de dados comportamentais e bioquímicos. Os resultados foram expressos em média + erro padrão da média (E.P.M.). A comparação entre os grupos experimentais e grupo controle foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de uma via (curva dose resposta e análises bioquímicas) ou duas vias (curva tempo-resposta da irisina ou BDNF em testes comportamentais). Após a ANOVA, foi realizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls, quando apropriado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Efeito da administração de irisinina no comportamento de camundongos submetidos ao TSC, TNF e TCA

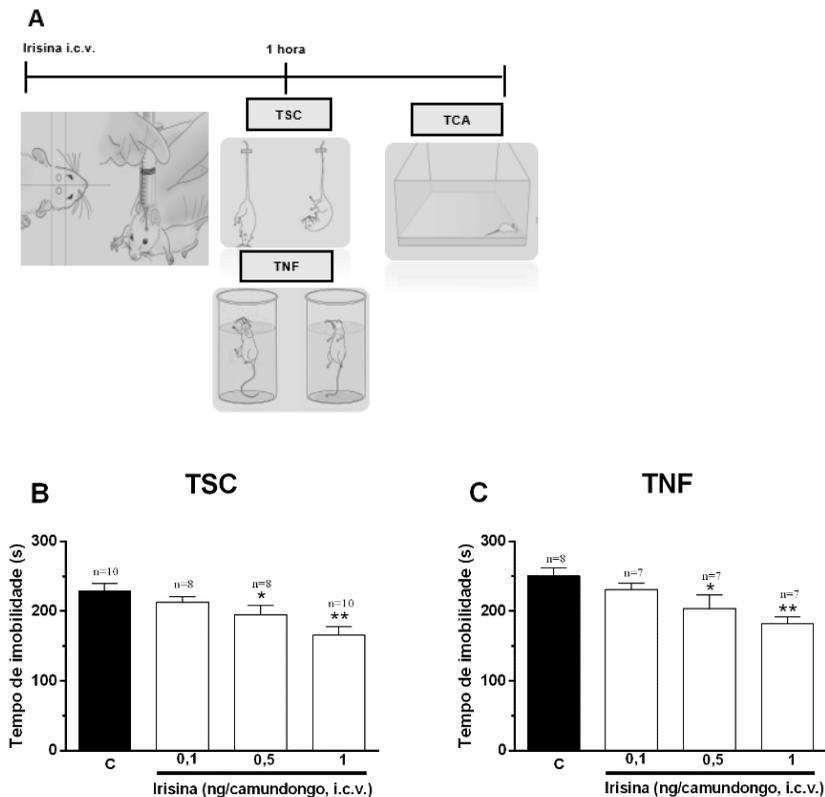
O efeito da administração central de irisinina (0,5-1 ng/camundongo) no tempo de imobilidade de camundongos submetidos ao TSC e TNF é mostrado nas **Figuras 5B e 5C**, respectivamente. Todos os testes comportamentais foram realizados 1 hora após as respectivas administrações, conforme ilustrado na **Figura 5A**. A ANOVA de uma via revela que o tratamento com irisinina é capaz de reduzir significativamente o tempo de imobilidade em camundongos no TSC [F (3, 32) = 6,21,  $p < 0,01$ ] e TNF [F (3, 25) = 4,75,  $p < 0,01$ ], quando comparados ao grupo controle. Posteriormente, a análise de *post-hoc* revela que a irisinina reduz o tempo de imobilidade em ambos os testes nas doses de 0,5 ng/camundongo ( $p < 0,05$ ) e 1 ng/camundongo ( $p < 0,01$ ).

O efeito da administração central de irisinina nas doses de 0,1, 0,5, e 1 ng/camundongo na atividade locomotora foi avaliado no TCA. As **Figuras 6 A-B** mostram que a administração central de irisinina não altera o número de cruzamentos [F (3, 32) = 0,60,  $p = 0,61$ ] e o número de levantamentos [F (3, 32) = 0,59,  $p = 0,62$ ], quando comparados com o grupo controle. No entanto, a administração central de irisinina aumentou o tempo no centro do TCA nas doses 0,5 e 1 ng/camundongo (**Figura 6C**), quando comparado ao seu respectivo controle, sugerindo um possível efeito tipo-ansiolítico desta miocina [F (3, 32) = 27,97,  $p < 0,01$ ]. A administração de irisinina (0,5 e 1 ng/camundongo) também reduziu o número de autolimpeza [F (3, 32) = 3,98,  $p < 0,01$ ] e de bolo fecal [F (3, 32) = 14,07,  $p < 0,01$ ] (**Figuras 6D-E**, respectivamente).

Considerando a ausência de dados na literatura sobre o possível efeito da irisinina no TNF, a dose de 1 ng/camundongo foi administrada via i.c.v. (dose com melhor efeito no TSC). Foi avaliado o tempo de imobilidade da irisinina ao longo do tempo. O efeito no TNF foi avaliado 30 min, 1 hora e 6 horas após a administração da molécula em grupos independentes. Os resultados descritos na **Figura 7A**, mostram que a irisinina reduz o tempo de imobilidade no TNF até 6 horas após sua administração. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento [F (1, 50) = 13,00,  $p < 0,05$ ], do tempo [F (3, 50) = 2,32,  $p < 0,01$ ], mas não da interação tempo x tratamento [F (3, 50) = 2,13,  $p = 0,10$ ]. Por outro lado, a administração central de irisinina não alterou o número de cruzamentos no TCA em nenhum dos tempos testados

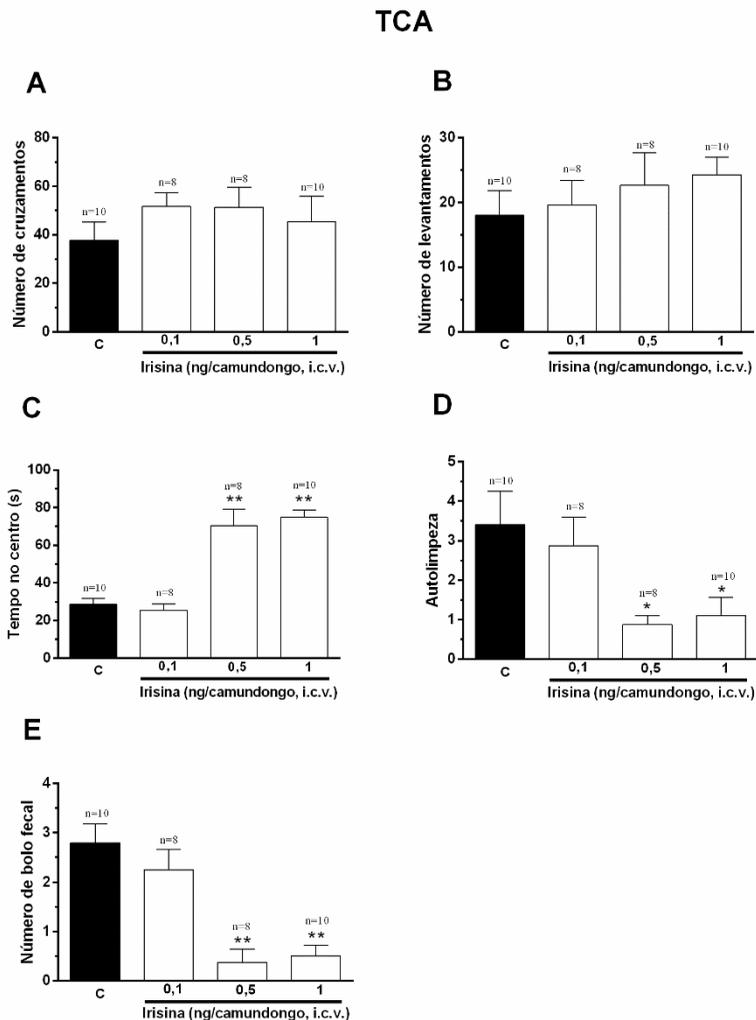
(Figura 7B). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tempo [F (3, 45) = 13,52,  $p < 0,01$ ], no entanto, houve um efeito significativo do tratamento com a irisina [F (1, 45) = 0,22,  $p = 0,64$ ] e da interação tempo x tratamento [F (3, 45) = 1,98,  $p = 0,13$ ] com maior número de cruzamentos em animais avaliados 1, 6 e 24 h quando comparados com animais avaliados 30 min após a administração.

Figura 5: Efeito da administração de irisina i.c.v. nas doses de 0,1-1 ng/camundongo.



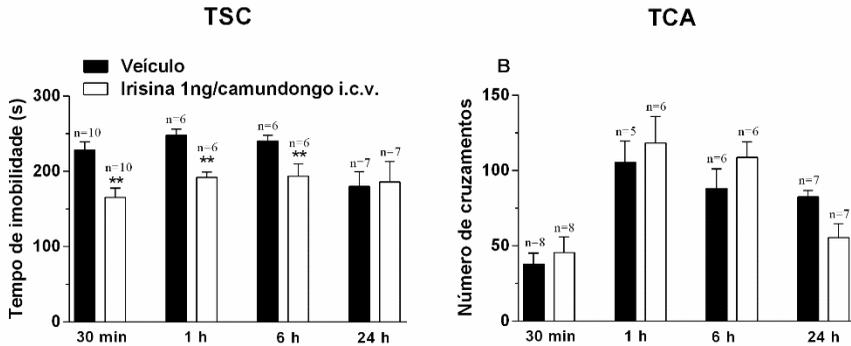
Legenda: Desenho experimental dos procedimentos realizados (A). Tempo de imobilidade nos testes comportamentais, TSC (B) e TNF (C). Os resultados são expressos como média + E. P. M. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  comparado com o grupo controle (representado no gráfico pela letra C). (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Painei A elaborado pela autora.

Figura 6: Efeito da administração de irisinina (0,1-1ng/camundongo, i.c.v.) sobre parâmetros comportamentais no TCA.



Legenda: O TCA é representado pelo número de cruzamentos (A). Número de levantamentos (B). Tempo no centro (C), autolimpeza (D) e bolo fecal (E). Os resultados são expressos como média + E.P.M. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  comparado com o grupo controle (representado no gráfico pela letra C) (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls).

Figura 7: Efeito tempo-resposta da administração de irisina (1 ng/ camundongo, i.c.v.) no TSC e no TCA.



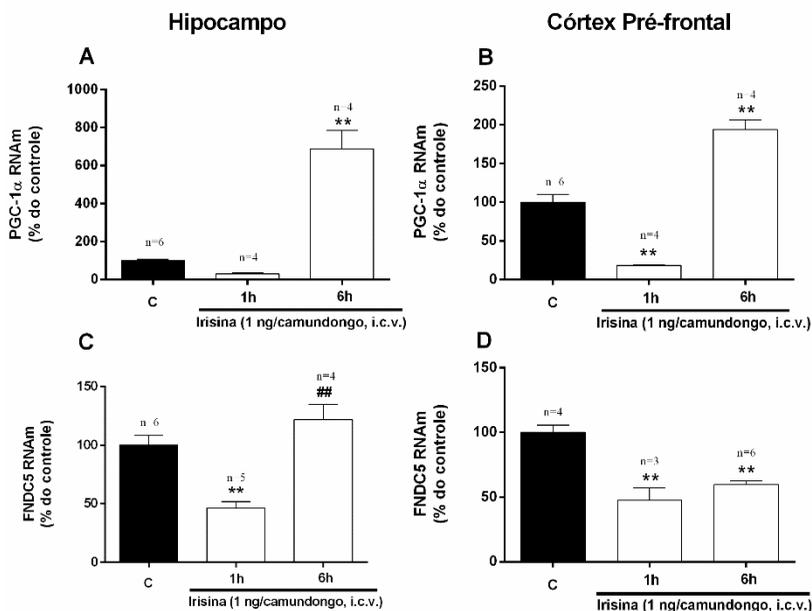
Legenda: Irisina i.c.v. no TSC (A) e no TCA (B) 30 min, 1, 6 e 24 horas após a administração. Os resultados são expressos em colunas, cada coluna representa a média + E. P. M. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \*\*  $p < 0,01$  comparado com o grupo controle (veículo).

### 3.3.2 Efeito da administração de irisina na expressão gênica de PGC1- $\alpha$ e FNDC5

Os efeitos da administração central de irisina sobre mudanças na expressão gênica de PGC1- $\alpha$  e FNDC5, tanto no hipocampo como no córtex pré-frontal de camundongos, foram investigadas 1 e 6 horas após o TSC. A administração de irisina foi capaz de aumentar o RNA mensageiro (RNAm) de PGC1- $\alpha$  no hipocampo 6 h após o tratamento quando comparado com seus respectivos controles [F (2, 11) = 51,10,  $p < 0,01$ , **Figura 8A**]. O RNAm de FNDC5 no hipocampo diminuiu 1 h após o tratamento com irisina e aumentou 6 h após o tratamento quando comparado ao grupo que recebeu a injeção em 1 hora [F (2, 12) = 17,60,  $p < 0,01$ , **Figura 8C**]. A irisina também diminuiu os níveis de RNAm de PGC1- $\alpha$  no córtex pré-frontal de camundongos 1 hora após a administração e aumentou os níveis de mRNA de PGC1- $\alpha$  6 h após o tratamento [F (2, 11) = 66,60,  $p < 0,01$ , **Figura 8B**]. Além disso, a expressão do RNAm de FNDC5 foi reduzida 1 h após a administração

de irisina em ambas as estruturas estudadas, sendo este efeito estatisticamente significativo até 6 h após a administração no córtex pré-frontal [F (2, 10) = 23,74,  $p < 0,01$ , **Figura 8D**].

Figura 8. Efeito da administração de irisina (1 ng/ camundongo, i.c.v.) na expressão gênica de PGC1- $\alpha$  e FNDC5.



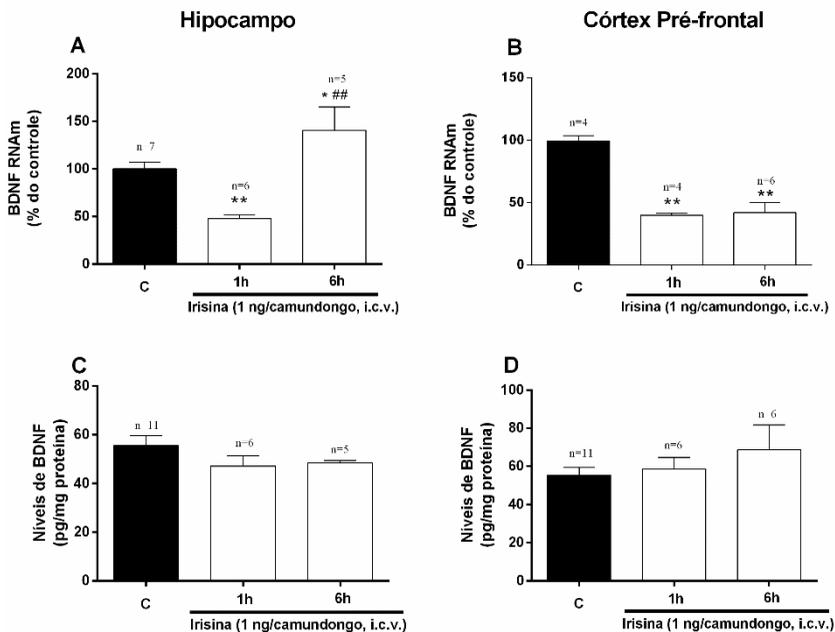
Legenda: O RNAm de PGC1- $\alpha$  no hipocampo (A) e no córtex pré-frontal (B) RNAm de FNDC5 no hipocampo (C) e no córtex pré-frontal (D) 1 ou 6 h após a administração de irisina. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. Os dados são expressos em média + E.P.M. e os resultados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \*\* $p < 0,01$  quando comparados aos seus respectivos controles (tratados com veículo, representado no gráfico pela letra C). ## $p < 0,01$  quando o RNAm de FNDC5 foi avaliado 6 horas após o tratamento comparando com o resultado obtido 1 h após o tratamento com irisina.

### 3.3.3 Influência da administração de irisina na expressão gênica de BDNF e nos níveis de BDNF

A **Figura 9A** mostra que o RNAm de BDNF hipocampal foi diminuído 1 h após o tratamento com irisina e aumentado 6 horas após o

tratamento quando comparado com o grupo controle [ $F(2, 15) = 11,91$ ,  $p < 0,01$ ]. No córtex pré-frontal a expressão do RNAm de BDNF foi reduzida em ambos os tempos avaliados (1 ou 6 h após o tratamento), quando comparados aos seus respectivos grupos controle [ $F(2, 11) = 24,47$ ,  $p < 0,01$ , **Figura 9B**]. Ainda na **Figura 9C-D**, a ANOVA de uma via revela que a administração de irisinina 1 ou 6 h antes de mensurar os níveis de BDNF não foi capaz de alterar os níveis desta neurotrofina tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal de camundongos [ $F(2, 19) = 1,38$ ,  $p = 0,27$ ;  $F(2, 20) = 0,85$ ,  $p = 0,44$ , respectivamente]. Os resultados estão sumarizados na **Tabela 1**.

Figura 9. Efeito da administração de irisinina (1 ng/camundongo, i.c.v.) na expressão de RNAm de BDNF e nos níveis de BDNF.



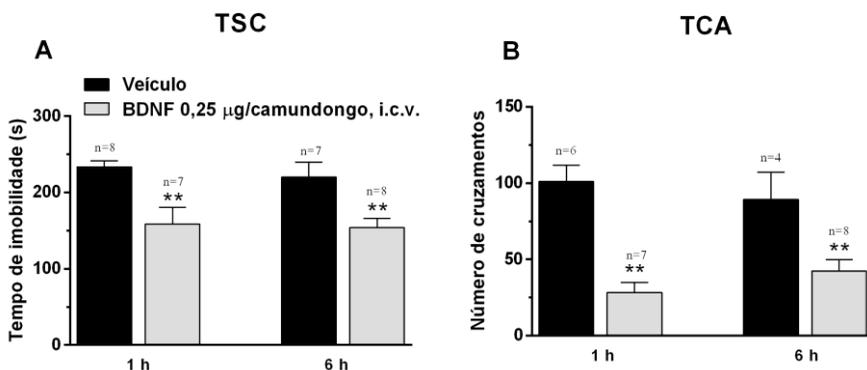
Legenda: O RNAm de BDNF no hipocampo (A) e no córtex pré-frontal (B), e os níveis de BDNF no hipocampo (C) e no córtex pré-frontal (D), 1 ou 6 h após a administração de irisinina. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. Dados foram expressos em média + E.P.M. para a expressão gênica RNAm, e pg/mg proteína para os níveis de proteína. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  quando comparados com seus respectivos

controles tratados com veículo (representado no gráfico pela letra C). ## $p < 0,01$  quando comparados o RNAm de BDNF 6 h após o tratamento com 1h.

### 3.3.4 Efeito da administração de BDNF na resposta comportamental de camundongos no TSC e no TCA

O BDNF na dose 0,25  $\mu\text{g}/\text{camundongo}$  foi administrado via i.c.v. e a resposta comportamental dos camundongos foi avaliada no TSC. O BDNF reduziu o tempo de imobilidade quando administrado 1 ou 6 h antes do TSC conforme mostrado na **Figura 10A** [tempo F (1, 26) = 0,33,  $p = 0,57$ ; tratamento F (1, 26) = 20,11,  $p < 0,01$ ; interação tempo x tratamento F (1, 26) = 0,06,  $p = 0,80$ ]. O número de cruzamentos no TCA foi significativamente reduzido no grupo tratado com BDNF (1 ou 6 h) quando comparados com o grupo controle [tempo F (1, 20) = 0,06,  $p = 0,80$ ; tratamento F (1, 20) = 29,65,  $p < 0,01$ ; interação tempo x tratamento [F (1, 20) = 1,96,  $p = 0,18$ , **Figura 10B**].

Figura 10: Efeito da administração de BDNF (0,25  $\mu\text{g}/\text{camundongo}$ , i.c.v.) no TCA e no TCA.

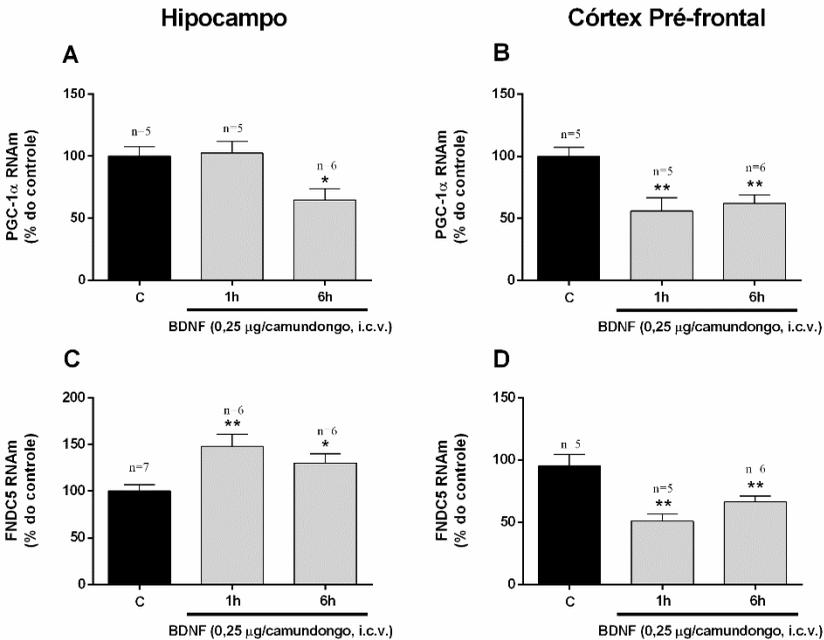


Legenda: BDNF i.c.v. no TSC (A) e no número de cruzamentos no TCA (B) 1 e 6 horas após a administração. Os resultados são expressos em colunas, cada coluna representa a média + SEM. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  comparado com o grupo controle (veículo).

### 3.3.5 Influência da administração de BDNF no RNAm de PGC1- $\alpha$ e FNDC5 e nos níveis de BDNF

A administração de BDNF reduziu o RNAm de PGC1- $\alpha$  no hipocampo 6 h após o tratamento, mas não afetou os níveis de RNAm de PGC1- $\alpha$  quando avaliado 1 hora antes de análise conforme mostra a **Figura 11A** [F (2, 13) = 5,90,  $p < 0,05$ ]. Também foram avaliados os níveis de RNAm de FNDC5, sendo possível observar um aumento no hipocampo, 1 e 6 horas após a administração [**Figura 11C**, F (2, 16) = 6,32,  $p < 0,01$ ]. Contudo, conforme descrito na **Figura 11B e 11D** tanto o RNAm para PGC1- $\alpha$  quanto para FNDC5 tiveram sua expressão reduzida no córtex pré-frontal 1 h após o tratamento e se mantiveram diminuído até 6 h após o tratamento com BDNF [FNDC5 RNAm F (2, 15) = 11,06,  $p < 0,01$ ; PGC1- $\alpha$  RNAm F (2, 13) = 7,89,  $p < 0,01$ ].

Figura 11. Efeito da administração de BDNF (0.25  $\mu$ g/camundongo, i.c.v.) na expressão do RNAm de PGC1- $\alpha$  e FNDC5.



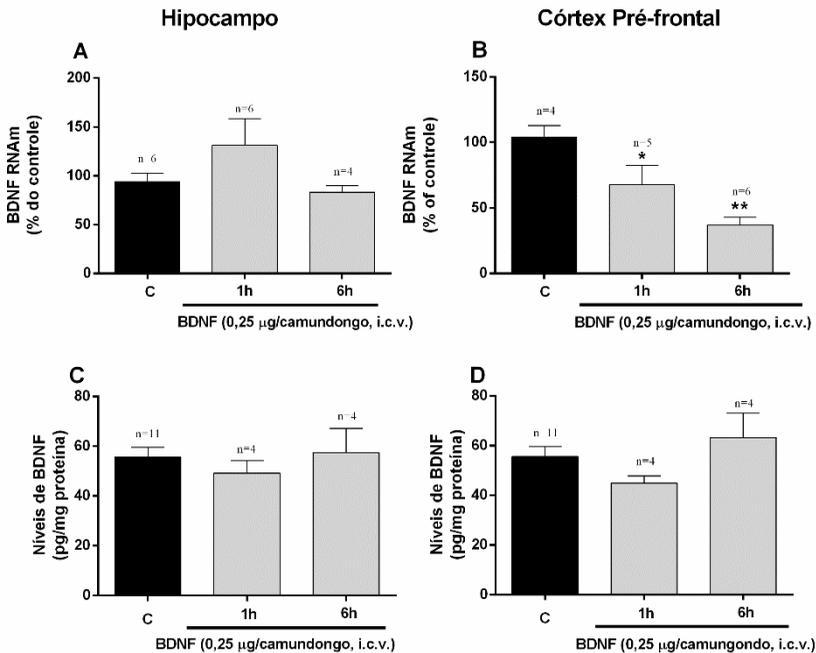
Legenda: RNAm de FNDC5 no hipocampo (A) e no córtex pré-frontal (B), RNAm de FNDC5 no hipocampo (C) e no córtex pré-frontal (D) 1 ou 6 h após a administração de BDNF. O número de animais em cada grupo está indicado

acima das barras. Os dados são expressos em média + E.P.M. e os resultados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  quando comparados com seus respectivos controles tratados com veículo (representados no gráfico pela letra C).

### 3.3.6. Influência da administração de BDNF na expressão gênica e níveis proteicos de BDNF

O efeito da administração de BDNF nos níveis proteicos e na expressão do RNAm de BDNF são mostrados na **Figura 12**. No córtex pré-frontal [ $F(2, 12) = 10,28$ ,  $p < 0,01$ ], o tratamento com BDNF em ambos os tempos analisados foi capaz de reduzir a expressão de RNAm de BDNF, porém este efeito não foi observado no hipocampo [ $F(2, 13) = 1,77$ ,  $p = 0,21$ ], (**Figura 12B e 12A**, respectivamente). No entanto, conforme mostrado na **Figura 12C e 12D** não foi verificada nenhuma alteração nos níveis de BDNF tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal após o tratamento com BDNF (1 ou 6 h antes) [ $F(2, 16) = 0,40$ ,  $p = 0,67$ ;  $F(2, 16) = 1,82$ ,  $p = 0,19$ , respectivamente]. Os resultados estão sumarizados na **Tabela 1**.

Figura 12. Efeito da administração BDNF (0,25  $\mu\text{g}/\text{camundongo}$ , i.c.v.) na expressão do RNAm e nos níveis de BDNF.



Legenda: Expressão de RNAm de BDNF no hipocampo (A) e no córtex pré-frontal (B), e níveis de BDNF no hipocampo (C) e no córtex pré-frontal (D) 1 ou 6 h após o tratamento com BDNF. O número de animais em cada grupo está indicado acima das barras. Os dados são expressos em média + E.P.M. e os resultados foram analisados através da ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  quando comparados com seus respectivos controles tratados com veículo (representados no gráfico pela letra C).

Tabela 1– Resumo dos resultados neuroquímicos obtidos no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos após a administração i.c.v. de irisina ou de BDNF.

	Hipocampo				Córtex pré-frontal			
	Irisina 1 ng/camundongo		BDNF 0,25µg/camundongo		Irisina 1 ng/camundongo		BDNF 0,25µg/camundongo	
	1 h	6 h	1 h	6 h	1 h	6 h	1 h	6 h
PGC-1 $\alpha$ RNAm	=	↑	=	↓	↓	↑	↓	↓
FNDC5 RNAm	↓	=	↑	↑	↓	↓	↓	↓
BDNF RNAm	↓	↑	=	=	↓	↓	↓	↓
BDNF níveis proteicos	=	=	=	=	=	=	=	=

Legenda: Efeito da administração i.c.v. de irisina (1ng/camundongo) ou de BDNF (0,25µ/camundongo) na expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ /FNDC5/BDNF e nos níveis de BDNF no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos, 1 e 6 horas após a administração.

### 3. 4 DISCUSSÃO

Os principais achados deste primeiro Capítulo apontam que a administração central de irisina é capaz de causar comportamento tipo-antidepressivo em camundongos em dois testes preditivos de ação antidepressiva TSC e TNF; a administração central de BDNF causa um efeito similar ao da irisina no comportamento; ambos os tratamentos alteram a expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ , FNDC5 e BDNF, mas não são capazes de alterar os níveis de BDNF, em duas estruturas intimamente correlacionadas com a depressão, o córtex pré-frontal e o hipocampo. O resumo destes efeitos neuroquímicos está representado na **Tabela 1**. Os resultados apresentados no presente estudo demonstram pela primeira vez na literatura o potencial tipo-antidepressivo da irisina.

Estudos clínicos divergem quanto ao envolvimento da irisina na regulação do humor. Um estudo de Papp e colaboradores (2017) mostrou que o humor afetado em pacientes com doença pulmonar obstrutiva está associado a baixos níveis séricos de irisina, enquanto um estudo realizado por Hofmann e colaboradores (2016) demonstrou que em mulheres obesas, os níveis plasmáticos de irisina não estão

associados com os sintomas depressivos, ansiedade e percepção de estresse (PAAP et al., 2017). Em relação aos estudos pré-clínicos, foi relatado que a administração central de irisina causou alterações comportamentais em ratos incluindo aumento da alimentação e hiperlocomação (ZANG et al., 2015b; TEKIN et al., 2017). Além disso, a administração subcutânea de irisina em ratos submetidos ao protocolo CUS, foi capaz de prevenir o comportamento anedônico no teste de preferência pela sacarose e reduzir o comportamento tipo depressivo no TNF (WANG; PAN, 2016). No entanto, no referido estudo, aparentemente o efeito da irisina no TNF não foi investigado em animais que não foram submetidos ao CUS.

Com base nestas observações, surge a necessidade de verificar o efeito da irisina em testes preditivos para fármacos antidepressivos. Desta forma, no presente estudo foi avaliado o efeito da administração central de irisina no TSC e no TNF, dois paradigmas comportamentais amplamente utilizados para triagem de atividade antidepressiva de fármacos. A irisina administrada centralmente nas doses de 0,5 e 1 ng/camundongo reduziu o tempo de imobilidade em ambos os testes indicando um perfil tipo-antidepressivo. No TSC, o efeito foi persistente até 6 horas após a sua administração. No entanto, após 24 horas o efeito tipo-antidepressivo da irisina foi abolido, um perfil de resposta comportamental similar ao observado após administração de fármacos antidepressivos convencionais (BETTIO et. al., 2014; NEIS et al., 2016). Nenhuma alteração na atividade locomotora foi observada em camundongos tratados com irisina no TCA, descartando a possibilidade de que os resultados obtidos em TSC e TNF sejam devidos a um efeito psicoestimulante decorrente da administração de irisina. A ausência de alterações na atividade locomotora contrasta com os resultados relatados por Zhang et al. (2015b), que mostraram que uma única dose alta de irisina (1,5-2,5 µg/kg, i.c.v.) causou um aumento abrupto e transitório na atividade locomotora de ratos (ZHANG et al., 2015b). Estas diferenças na locomoção são provavelmente devidas às doses utilizadas e/ou espécies distintas.

No TCA, parâmetros relacionados a comportamentos de ansiedade (tempo no centro, número de autolimpeza e bolo fecal) foram avaliados. A administração de irisina foi capaz de aumentar o tempo no centro do aparato, sugerindo um efeito tipo-ansiolítico desta miocina. A irisina também diminuiu o número de autolimpeza e bolo fecal dos camundongos durante o teste. O perfil ansiolítico da irisina foi observado nas doses de 0,5 e 1,0 ng/camundongo, ou seja, as mesmas doses capazes de promover efeito tipo-antidepressivo no TSC e TNF.

No entanto, dados da literatura não estão de acordo com nossos achados. A frequência de autolimpeza e tempo no centro foram inalterados em ratos tratados com uma única dose de irisina administrada por via i.c.v. (ZHANG et al., 2015b). Além disso, um estudo recente reportou o efeito ansiogênico da administração central da irisina em ratos (CHIAVAROLI et al., 2017). Estas discrepâncias sugerem que ratos e camundongos produzem diferentes padrões comportamentais relacionados à ansiedade, após a administração central de irisina.

A literatura reporta que o exercício físico induz a expressão do PGC-1 $\alpha$  no músculo. O possível papel do PGC-1 $\alpha$  na regulação do humor foi sugerido por um estudo que relatou que camundongos nos quais o PGC-1 $\alpha$  foi super expresso no músculo eram resilientes ao desenvolvimento de comportamento do tipo-depressivo induzido pelo protocolo de estresse crônico leve (AGUDELO et al., 2014). Ademais, camundongos PGC-1 $\alpha$ <sup>-/-</sup> apresentaram uma redução da expressão de FNDC5 no córtex cerebral, quando comparados com camundongos selvagens (WRANN et al., 2013). Assim sendo, foi verificado se a administração central de irisina seria capaz de alterar a expressão gênica de PGC-1 $\alpha$  e FNDC5 no hipocampo e no córtex pré-frontal de camundongos. A administração de irisina diminuiu o RNAm de PGC-1 $\alpha$  no córtex pré-frontal após 1 hora e aumentou a expressão de PGC-1 $\alpha$  no hipocampo e córtex pré-frontal após 6 h. O tratamento com irisina também diminui a expressão gênica de FNDC5 em ambas as estruturas cerebrais. No hipocampo esta redução foi transiente, uma vez que este efeito não persistiu até 6 horas após a administração. Por outro lado, no córtex pré-frontal a redução foi mantida por até 6 horas. Embora o RNAm de PGC-1 $\alpha$  não tenha sido alterado (1 h no hipocampo) ou mesmo diminuída (1 h no córtex pré-frontal), sua expressão foi aumentada 6 h após a administração de irisina em ambas as estruturas estudadas. Digno de nota, o aumento da expressão gênica de PGC-1 $\alpha$  em várias regiões cerebrais (tronco encefálico, lobo frontal, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo) e no músculo sóleo foi relatado em camundongos submetidos a um protocolo de exercícios físicos de 8 semanas (STEINER et al., 2011). Em relação ao FNDC5, não houve alteração (6 horas no hipocampo) ou ocorreu uma redução da sua expressão gênica (1 h no hipocampo, 1 e 6 horas no córtex pré-frontal) após a administração central de irisina. Dados da literatura indicam que o aumento da irisina não está associado com o aumento da expressão gênica de FNDC5 no músculo, o que está de acordo com os resultados aqui encontrados em estruturas cerebrais (FAIN et al., 2013; TIANO; SPRINGER; RANE, 2015).

A irisina tem sido associada com efeitos benéficos no humor e com o aumento da expressão de BDNF em algumas regiões cerebrais (PAPP et al., 2017; WRANN et al., 2013). Neste sentido foi relatado que pacientes com doença pulmonar obstrutiva apresentavam distúrbios de humor e estes distúrbios estavam associados a baixos níveis séricos de irisina e BDNF (PAPP et al., 2017). O BDNF hipocampal mostrou ser regulado positivamente pela entrega periférica de FNDC5 por vetores virais bem como pela prática de atividades físicas em camundongos. Ainda, foi relatado um aumento de BDNF quando FNDC5 foi superexpresso em neurônios corticais, enquanto que a redução da expressão de FNDC5 causou uma redução na expressão de BDNF (WRANN et al., 2013). No presente estudo o efeito da administração central de irisina nos níveis proteicos e expressão gênica de BDNF foram avaliados. No hipocampo a irisina diminuiu o RNAm de BDNF 1 hora após a administração, mas aumentou a expressão desta neurotrofina após 6 horas. No córtex pré-frontal, o RNAm diminuiu em ambos os tempos analisados e não houve alterações nos níveis proteicos de BDNF. Isso provavelmente ocorre devido ao fato de que os períodos de tempo avaliados não terem sido suficientes para alterar a tradução da proteína. No córtex pré-frontal (1 h e 6 h) e no hipocampo (1 h) a diminuição na expressão gênica do BDNF ocorreu paralelamente com uma redução no RNAm de FNDC5. Este resultado corrobora com o estudo de Warnn et al. (2013), que mostra que o FNDC5 é um regulador positivo da expressão do BDNF.

Em relação à etiologia da depressão propõe-se a existência de uma possível relação entre o mecanismo de ação dos compostos antidepressivos e uma modulação de vias de sinalização intracelulares, principalmente mediadas pelo BDNF, relacionadas com a neuroplasticidade e a sobrevivência de neurônios, cujo processo mediaria os efeitos tardios e adaptativos dos fármacos antidepressivos na remissão de sintomas (NICIU et al., 2013; POPOLI et al., 2000). No nosso estudo, a administração central de BDNF produziu efeito tipicamente antidepressivo no TSC 1 e 6 horas após a sua administração, de forma semelhante ao observado com a irisina. Este efeito não pode ser atribuído a um efeito psicoestimulante do BDNF, pois a administração de BDNF causou hipolocomoção no TCA, o que pode ter subestimado a capacidade do BDNF em reduzir o tempo de imobilidade no TSC. Semelhante aos nossos resultados, o BDNF administrado no hipocampo diminuiu o tempo de imobilidade em ratos no TNF quando comparados ao grupo controle (SHIRAYAMA et al., 2002; SIRIANNI et al., 2010). Um estudo de Shirayama et al. (2002) mostrou que o efeito do BDNF no

TNF pode ser observado até 3 dias após sua infusão. Ainda, um estudo demonstrou que o BDNF administrado via i.c.v. produziu um efeito tipo-antidepressivo no TNF modificado, reduzindo a imobilidade e aumentando o tempo de natação, sendo estes efeitos persistentes até 6 dias após a administração desta neurotrofina em ratos (HOSHAW; MALBERG; LUCKI 2005). De particular relevância para os efeitos comportamentais encontrados aqui, o BDNF é considerado um mediador chave da eficácia clínica dos antidepressivos (BJORKHOLM; MONTEGGIA, 2016).

Camundongos portadores do polimorfismo genético do BDNF ( $\text{BDNF}^{\text{Met/Met}}$ ), não são sensíveis aos efeitos benéficos do exercício físico de *endurance* e apresentam menores índices de neurogênese hipocampal, menor expressão gênica de BDNF e FNDC5 reduzida no GD hipocampal, além de não responderem positivamente após o exercício físico em testes preditivos de ação antidepressiva como o TNF (IERACI et al., 2016). Outra observação importante da literatura é que a incubação com BDNF reduz a expressão gênica de FNDC5 em neurônios corticais e este efeito é abolido quando estes neurônios são pré-incubados com K252a (um antagonista dos receptores TrkB), sugerindo um *feedback loop* homeostático entre FNDC5/BDNF (WRANN et al., 2013). No presente estudo foi investigado o efeito da administração central de BDNF na expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ , FNDC5 e BDNF no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos. O BDNF diminuiu a expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ , FNDC5 e BDNF no córtex pré-frontal quando administrado 1 e 6 horas antes das análises. Além disso, a administração de BDNF aumentou o RNAm de FNDC5 (1h e 6h) e diminui PGC1- $\alpha$  (6 h) e não foi capaz de alterar a expressão gênica de BDNF no hipocampo. Por outro lado, a expressão de FNDC5 foi reduzida em neurônios hipocampais expostos ao BDNF (WRANN et al., 2013) e um estudo prévio mostrou que o BDNF administrado por via i.c.v. (duas administrações com 3 dias de intervalo 300 ng/sítio) aumentou o RNAm de BDNF no hipocampo, mas não no córtex pré-frontal de camundongos de uma linhagem sensível a catalepsia (incapacidade de mover os membros), 21 dias após a administração (TIKHONOVA; KULIKOV, 2012). Adicionalmente, Valvassori e colaboradores (2015) revelaram que a administração de BDNF (0,25  $\mu\text{g}/\text{rato}$ , i.c.v.) foi capaz de aumentar os níveis desta neurotrofina no hipocampo e córtex pré-frontal 7 dias após sua administração. No presente estudo a administração central de BDNF não alterou os níveis proteicos de BDNF em ambas as estruturas estudadas (córtex pré-frontal e hipocampo), mas as razões pelas quais isso ocorre são desconhecidas.

É possível que os resultados comportamentais observados no tratamento com BDNF não reflitam necessariamente alterações nos níveis desta neurotrofina em regiões encefálicas específicas, mas sim mudanças em vias de sinalização intracelular implicadas nas respostas comportamentais. Discrepâncias entre os resultados aqui relatados e dados da literatura podem ser atribuídas às diferentes espécies utilizadas ou ao período de tempo no qual as análises foram realizadas (o tempo de análise no presente estudo foi curto quando comparado com a literatura). Coletivamente os dados apresentados relatam que a administração central de irisina é capaz de produzir um comportamento tipo-antidepressivo similar ao perfil comportamental demonstrado na administração de BDNF. Os resultados fornecem indícios da capacidade da irisina em modular a expressão gênica de PGC-1 $\alpha$ , FNDC5 e BDNF de maneira tempo dependente, reforçando o papel destes genes na regulação do humor.

#### 4 CAPÍTULO II: EFEITO PRÓ-NEUROGÊNICO E ANTIDEPRESSIVO DE UM PROTOCOLO DE EXERCÍCIOS FÍSICOS DE *ENDURANCE* EM CAMUNDONGOS: O POSSÍVEL PAPEL DA VIA DE SINALIZAÇÃO FNDC5/IRISINA

Uma das características fisiopatológicas associada a depressão corresponde à observação, por meio de estudos de imagem em tecidos *post-mortem* e de neuroimagem em pacientes (DREVETS, 2001; SHELINE, 2012) de uma diminuição do volume em algumas estruturas límbicas, principalmente do hipocampo, o que por sua vez, estaria associado a uma redução da neurogênese (DRANOVSKY; HEN, 2006; MILLER; HEN, 2015). A literatura reporta que o exercício físico é capaz de exercer comportamento tipo-antidepressivo em camundongos (DUMAN et al., 2008), sendo que este evento estaria pelo menos em parte relacionado a um aumento da neurogênese hipocampal (DUMAN et al., 2008; SIERAKOWIAK et al., 2015). Especialmente o exercício físico de *endurance* (esforços com duração maior que 1 min) teria esta capacidade de estimular a neurogênese (CHAMARI; PADULO, 2015). Cabe ressaltar que estudos em modelos animais demonstram que a corrida na esteira de baixa ou moderada intensidade aumenta a neurogênese em roedores (INOUE et al., 2015; LOU et al., 2008; NOKIA et al., 2016), enquanto o mesmo efeito não foi observado na prática de exercícios físicos de alta intensidade ou de alongamento (INOUE et al., 2015; NOKIA et al., 2016).

Após o exercício físico em resposta à contração muscular ocorre a liberação de miocinas, moléculas responsáveis pelo menos em parte, pelos benefícios da prática de exercícios físicos no encéfalo (SCHNYDER; HANDSCHIN, 2015). Uma destas moléculas é a irisina, uma miocina formada a partir da glicosilação e clivagem da proteína transmembrana FNDC5 (BOSTRÖM et al., 2012). Os benefícios do exercício físico têm sido associados a liberação de irisina em vários modelos animais de neuropatologias incluindo isquemia cerebral e depressão (LI et al., 2017; WANG; PAN, 2016). Além disso, a superexpressão de irisina ou FNDC5 foi associada com neuroplasticidade através da modulação da proliferação celular (MOON; DINCER; MANTZOROS, 2013), diferenciação neuronal (FOROUZANFAR et al., 2015), e síntese de neurotrofinas (WRANN et al., 2013). Neste sentido o Capítulo II teve por objetivo examinar o efeito tipo antidepressivo e pró-neurogênico do exercício físico de *endurance* e sua relação com a via FNDC5/irisina.

## 4.1 OBJETIVOS

### 4.1.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do exercício físico de *endurance* sobre a neurogênese e sua relação com a via FNDC5/irisina no hipocampo.

### 4.1.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil comportamental de camundongos em testes preditivos de ação antidepressiva: teste do nado forçado (TNF), teste de suspensão pela cauda (TSC) e teste do campo aberto (TCA) após um protocolo de exercícios físicos de *endurance*.

- Avaliar o efeito de exercícios físicos de *endurance* na proliferação neuronal no GD hipocampal em camundongos.

- Examinar o efeito de exercícios físicos de *endurance* na diferenciação neuronal no GD hipocampal em camundongos.

- Avaliar o efeito de exercícios físicos de *endurance* na sobrevivência neuronal no GD hipocampal em camundongos.

- Examinar o efeito de exercícios físicos de *endurance* sobre a expressão de irisina no GD hipocampal em camundongos, 6 horas e 24 horas após a última sessão de exercícios físicos.

- Quantificar o imunoconteúdo do fragmento C-terminal de FNDC5 e de irisina no hipocampo de camundongos após 4 semanas de exercícios físicos de *endurance* (24 horas após a última sessão de exercícios).

## 4.2 METODOLOGIA

### 4.2.1 Animais

Nesta segunda etapa, foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas (30-40g, entre 40 e 70 dias de vida ao final do protocolo) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brazil). Os camundongos foram mantidos a 20-22°C com livre acesso a água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12/12 h (luzes acesas às 07:00 da manhã) e foram aclimatados durante

pelo menos 7 dias antes do início do protocolo experimental. Os camundongos foram alojados em gaiolas com 41×34×16 cm (12 camundongos por caixa). Todas as manipulações foram realizadas entre 13:00 e 17:00h. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Guia dos Institutos Nacionais de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Número do protocolo: 4871200317). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais usados nesses experimentos.

#### **4.2.2 Protocolo experimental do exercício físico de *endurance***

O protocolo de exercício físico de *endurance* foi realizado em esteira rolante (mostrado na **Figura 13**). Os camundongos foram habituados ao aparelho de esteira (Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) por 45 minutos por dia, durante um período de 5 dias (durante esse período de habituação a esteira permaneceu desligada). Após a habituação, os camundongos foram randomizados em dois grupos: exercitados e controle (não exercitados). Os camundongos do grupo exercitado foram colocados na esteira por 45 min por dia, 5 dias por semana (segunda a sexta-feira) durante 4 semanas. A corrida na esteira foi realizada entre 13:00 e 15:00. A velocidade da esteira foi progressivamente aumentada (um incremento de 2 m / min por semana) durante o período das 4 semanas, iniciando em 8 m / min no início do protocolo e concluindo com 16 m / min ao final do protocolo. Os camundongos do grupo controle (grupo não exercitado) permaneceram em suas caixas na mesma sala (ambiente com a esteira) dos camundongos exercitados durante a execução do protocolo, sendo desta maneira expostos ao barulho da esteira em funcionamento. Vinte e quatro horas após a última sessão do treinamento, os camundongos foram testados no TSC, TCA e foram imediatamente decapitados para posteriores análises. O cérebro de cada animal (n = 8 por grupo) foi removido e os hipocampus foram processados para imunoblotting (**Figura 13**). Para o ensaio de proliferação celular, outro grupo de camundongos foi submetido a 3 injeções intraperitoneais (i.p.) de 12 em 12 horas de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante o período de habituação e em seguida realizou o protocolo de exercício físico de *endurance*. Vinte e quatro horas após a última sessão de treinamento, os camundongos foram testados no TNF e logo após, foram perfundidos transcárdiacamente e seus cérebros foram processados para imuno-

histoquímica (n = 8 por grupo). Outro grupo de camundongos recebeu 6 injeções de 12 em 12 horas i.p. de BrdU durante os 3 últimos dias do protocolo de exercício físico de *endurance*, e o tecido foi analisado para diferenciação e sobrevivência celular. Além disso, um grupo independente foi submetido ao protocolo de exercícios e seus cérebros foram perfundidos e coletados 6 ou 24 horas após a última sessão de exercícios para análise do fragmento C-terminal da proteína FNDC5 (n = 7 por grupo).

#### **4.2.3 Administração de BrdU**

Para avaliar a proliferação celular e sobrevivência neuronal o BrdU, um marcador exógeno análogo da timidina que é incorporado ao DNA na fase de replicação celular, fase S do ciclo celular e permanece nas células uma vez que elas se tornam pós-mitóticas (COOPER-KUHN; GEORG KUHN, 2002), foi utilizado. Todos os camundongos receberam injeções de BrdU (100 mg/kg, i.p.) a cada 12 horas por 3 dias consecutivos e subsequentemente foram eutanasiados 24 horas após a última injeção (para análise de proliferação celular) e 28 dias após a última injeção (para análise de sobrevivência celular) conforme previamente descrito (BANASR et al., 2006; GIL-MOHAPEL et al., 2013; KONDO et al., 2014).

#### **4.2.4 Teste de suspensão pela cauda (TSC)**

A imobilidade no TSC previamente descrito por Steru et al. (1985), consiste em suspender os camundongos a 50 cm acima do chão por fita adesiva colocada aproximadamente a 1 cm da ponta da cauda e cronometrar o tempo de imobilidade dos animais durante um período de 6 min. A diminuição no tempo de imobilidade dos camundongos neste teste é considerada um comportamento tipo-antidepressivo (STERU et al., 1985).

#### **4.2.5 Teste do campo aberto (TCA)**

Desenvolvido por Hall (1934), o TCA é usado como uma ferramenta para avaliar a atividade locomotora em roedores (HALL, 1934). Neste teste os camundongos foram colocados em uma caixa (40x60x50 cm) dividida em 12 quadrantes iguais. Para cada camundongo o número de quadrantes cruzados com as 4 patas foi registrado por 6 minutos. O número total de cruzamentos foi utilizado

como medida da atividade locomotora. O aparelho foi limpo com etanol 10% entre as sessões, de modo a eliminar quaisquer sinais olfativos deixado pelos animais.

#### **4.2.6 Teste do nado forçado (TNF)**

Descrito pela primeira vez por Porsolt et al. (1977), o TNF é baseado na observação de que animais submetidos a uma situação inescapável, após um período de agitação inicial, adotam uma postura de imobilidade, realizando apenas movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água (PORSOLT; PICHON; JALFRE, 1977). Esse comportamento está supostamente relacionado à falta de motivação para escapar da situação estressante a que foram expostos. Este teste é sensível a todas as classes de antidepressivos, os quais são capazes de diminuir o tempo de imobilidade dos animais. Os animais foram colocados individualmente em um recipiente cilíndrico aberto na extremidade superior (diâmetro, 10 cm; altura, 25 cm), preenchidos com 19 cm de água (profundidade) a  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . O tempo de imobilidade (em segundos) foi registrado por 6 minutos.

#### **4.2.7 Processamento do tecido**

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com isoflurano e perfundidos transcárdialmente 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  $4^{\circ}\text{C}$  e depois transferidos para uma solução 30% de sacarose. Após a saturação em sacarose, secções coronais foram obtidas de forma seriada em um vibrátomo (Vibratome, Series 1000, St. Louis, MO, EUA ®) a uma espessura de 30  $\mu\text{m}$ . As fatias foram coletadas de forma seriada 1/6 para cada amostra e armazenadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) a 0,1 M contendo azida 0,5% a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.8 Ensaio de imuno-histoquímica**

Para avaliar a proliferação celular e sobrevivência o ensaio de imuno-histoquímica contra BrdU foi realizado. As fatias foram incubadas por 30 min em 1 M HCl a  $67^{\circ}\text{C}$  para desnaturação do DNA, e subsequentemente incubadas com soro de bloqueio (5% normal horse serum em 0.1 M PBS contendo 0.25% Triton X-100 por 1 h). Após o bloqueio as fatias foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-

BrdU produzido em camundongos (1:100; Dako, Santa Clara, CA, USA) em 2% solução de bloqueio a 4°C por 48 h. Além disso, o ensaio de imuno-histoquímica foi realizado contra a proteína Ki-67, um marcador endógeno do ciclo celular que é expresso em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M) (SCHOLZEN; GERDES, 2000). As fatias do cérebro foram incubadas duas vezes em 10 mM de ácido cítrico (dissolvido em 0.1 M PBS, pH=6.0) por 5 min a 95°C para a completa exposição do antígeno. Após a lavagem em 0.1M PBS, as fatias foram mergulhadas em 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 10% metanol em 0.1 M PBS por 10 min em temperatura ambiente (TA). Após o enxague em 0.1M PBS, o tecido foi bloqueado com 5% de solução de bloqueio (5% normal goat serum in 0.1M PBS com 0.25% Triton X-100) e incubado com o anticorpo monoclonal primário contra Ki-67 produzido em coelhos (1:300; Abcam, Burlingame, CA, USA) por 48 h à 4°C. As fatias foram incubadas com anticorpo secundário anti-camundongo IgG conjugado à biotina (para o ensaio de imunohistoquímica de BrdU) ou com anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado à biotina (para o ensaio de imunohistoquímica para Ki-67) (1:200; Vector Laboratories, Peterborough, UK) em 5% de solução de bloqueio a temperatura ambiente por 2h. Para avaliar a maturação neuronal, foi realizada a imuno-histoquímica contra DCX, uma proteína associada a microtúbulos especificamente expressa em neuroblastos migratórios (ou seja, neurônios imaturos) (BROWN et al., 2003; COUILLARD-DESPRES et al., 2001; COUILLARD-DESPRES et al., 2005). Além disso, realizamos o ensaio de imuno-histoquímica para avaliar a expressão do fragmento C-terminal de FNDC5 (o precursor da irisina) no GD hipocampal. As fatias do encéfalo foram mergulhadas em solução contendo 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 10% metanol em 0.1 M PBS por 15 min em temperatura ambiente. Após o enxague em 0.1 M PBS, os tecidos foram bloqueados com solução de bloqueio 5% (5% sêrum house em 0.1 M tampão PBS com 0.25% Triton X-100) e incubados com anticorpo primário policlonal produzido em cabras contra o DCX (1:400; Santa Cruz Biotechnology, Mississauga, CA) ou com anticorpo primário policlonal produzido em coelhos contra o fragmento C-terminal de FNDC5 (1:200; Abcam, Cambridge, UK) por 48 h a 4°C. Subsequentemente as fatias foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG para FNDC5 conjugado à biotina e anticorpo anti-IgG conjugado à biotina para DCX (ambos anticorpos foram diluídos 1:200; Vector Laboratories, Peterborough, UK) em solução de bloqueio 5% em temperatura ambiente por 2 horas.

Para todos os ensaios de imunohistoquímica anticorpos ligados foram visualizados usando um sistema complexo de avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Peterborough, UK) com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories, Peterborough, UK) como agente cromogênico. As secções foram montadas em lâminas de microscópio revestidas com gelatina a 2%, desidratadas em uma série de soluções de etanol com concentrações crescentes seguidas de uma incubação de 5 minutos com xileno P.A. e montadas com lamínulas coladas com cola específica (Entellan, Merck, Darmstadt, Germany).

#### **4.2.9 Quantificação morfológica**

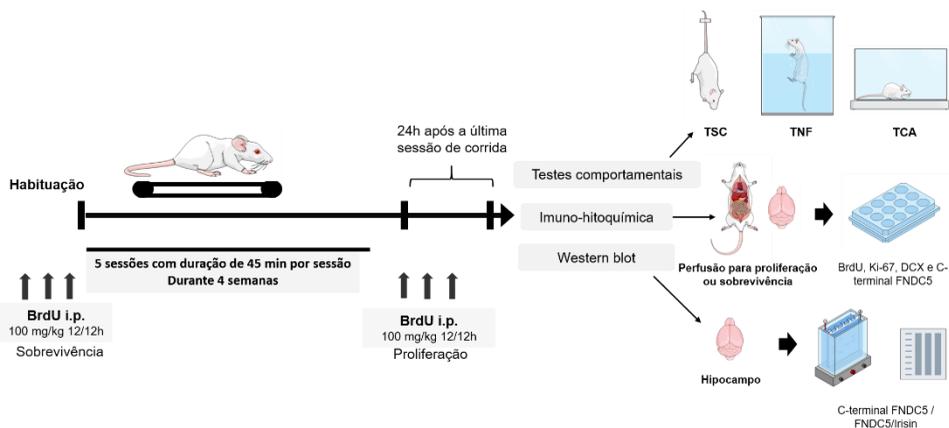
A quantificação foi realizada em lâminas utilizando um microscópio scan nas dependências do LAMEB -UFSC (Axio Scan Z1, Zeiss, Jena, Alemanha). O número total de células para BrdU, Ki-67, DCX e fragmento C-terminal de FNDC5 imunopositivas presentes na ZSG do GD total (de posterior a Bregma 1.34 até 3.16; aproximadamente dez sessões coronais por cérebro), no GD dorsal (de posterior a Bregma 1.34 até 2.18; aproximadamente cinco sessões coronais por cérebro) e GD ventral (de posterior a Bregma 2.30 até 3.16; aproximadamente cinco sessões coronais por cérebro) (FRANKLIN, 2008) foram quantificadas através de contagem manual. Todas as células DAB-positivas presentes na ZSG com 3-4 diâmetros foram consideradas como células positivas. Os resultados foram expressos como número total de células marcadas na sub-região GD do hipocampo multiplicando o número médio de células marcadas por fatia GD, pelo número total de fatias (sendo cada fatia de 30 µm de espessura), sendo o GD inteiro (60 fatias), dorsal (30 fatias) ou ventral (30 seções). As imagens foram scaneadas com objetiva de 20X e processadas com software específico do microscópio Axio Scan- Zen 2012 blue edition® – Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2011 o qual permite a visualização e amplificação das imagens no computador. Em seguida montadas no Microsoft PowerPoint 2010. Somente ajustes de contraste e cor foram realizados.

#### **4.2.10 Imunodeteção de proteínas por *Western Blotting***

Para quantificar o imunoconteúdo do fragmento C-terminal de FNDC5 e FNDC5/irisina o ensaio de *Western Blotting* foi realizado conforme previamente descrito (LEAL et al., 2002). Os hipocampus

foram dissecados e homogeneizados em tampão de lise [137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP40, 10% glicerol, protease e um coquetel de inibidor de fosfatases. O conteúdo total de proteínas foi determinado em todo o lisado usando albumina de soro bovino como padrão (LOWRY et al., 1951). Os hipocampus dos camundongos não exercitados e exercitados (n=10/grupo), foram mecanicamente homogeneizados em 500 µl de tampão (200 mM Tris, 40 mM EDTA, 4% SDS, pH 6.8) e posteriormente fervidos por 5 min. Ao homogenato foi adicionado (1:4 v/v; 40% glicerol, 50 mM Tris, e o mínimo de azul de bromofenol ) e β-mercaptoetanol na concentração final de 5 %. A mesma quantidade de proteína (30 µg por poço) para cada amostra foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida (concentração 14% de acrilamida) contendo SDS (SDS-PAGE) e gel de entrada com 4% de acrilamida. A seguir, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose usando um sistema de transferência a 40 mV e 216 mA por 90 min (ECL Semi-dry Blotters, Amersham Biosciences, England). Para verificar a eficiência da transferência, os géis foram corados com Coomassie blue e as membranas com Ponceau S. As membranas foram bloqueadas (1 h) com 5% leite desnatado em TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5). O imunoc conteúdo foi marcado com anticorpo primário policlonal para o fragmento C-terminal de FNDC5 produzido em coelhos (1:200; Abcam, Cambridge, UK) e anticorpo policlonal contra a irisina produzido em coelhos (1:200; Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA) e anticorpo policlonal contra β-actina (1:1000; Cell Signaling®, Beverly, MA, USA) foram detectadas usando anticorpos específicos incubados ao longo de uma noite e diluídos em TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween-10, pH 7.5) contendo 2.5 % de albumina de soro bovino. As membranas foram incubadas com anticorpo policlonal secundário anti-coelho conjugado a peroxidase (1:5000; Cell Signaling®, Beverly, MA, USA) por 1 h e as reações visualizadas por quimioluminescência (LumiGLO, Cell Signaling, Beverly, MA, USA). Todos os passos de bloqueio e incubação foram seguidos por três lavagens (5 minutos) das membranas com TBS-T. A densidade ótica das bandas foi quantificada usando o programa Image Lab software 4.1, seguindo instruções do fabricante (Bio-Rad, Hercules, CA). Os resultados foram expressos como fragmento C-terminal de FNDC5 /β-actin (22 kDa); FNDC5/Irisin/β-actin (25 kDa) e comparados com o grupo não exercitado (100%). O diagrama experimental está resumido na **Figura 13**.

Figura 13. Linha do tempo dos procedimentos experimentais.



Legenda: Camundongos *Swiss* fêmeas adultas foram submetidas ao protocolo de treinamento que consistiu na prática de exercícios físicos de *endurance* (corrida em esteira rolante). Decorridas 24 horas da última sessão de treinamento os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais, TSC e TCA. Subsequentemente foram sacrificados e seus hipocampus foram removidos e processados para a detecção de proteínas por Western Blotting para o fragmento C-terminal de FNDC5 e para FNDC5/irisina (24 horas após a última sessão de treinamento). Outro grupo de animais foi submetido ao TNF após a prática do mesmo protocolo, foi perfundido transcárdialmente e seus cérebros foram processados para o ensaio de imuno-histoquímica com intuito de analisar proliferação celular, diferenciação neuronal e sobrevivência celular (24 horas após a última sessão de treinamento). Também foi analisada a expressão do fragmento C-terminal de FNDC5 6 ou 24 horas após a última sessão de exercícios físicos no GD hipocampal através de imuno-histoquímica.

#### 4.2.11 Análise estatística

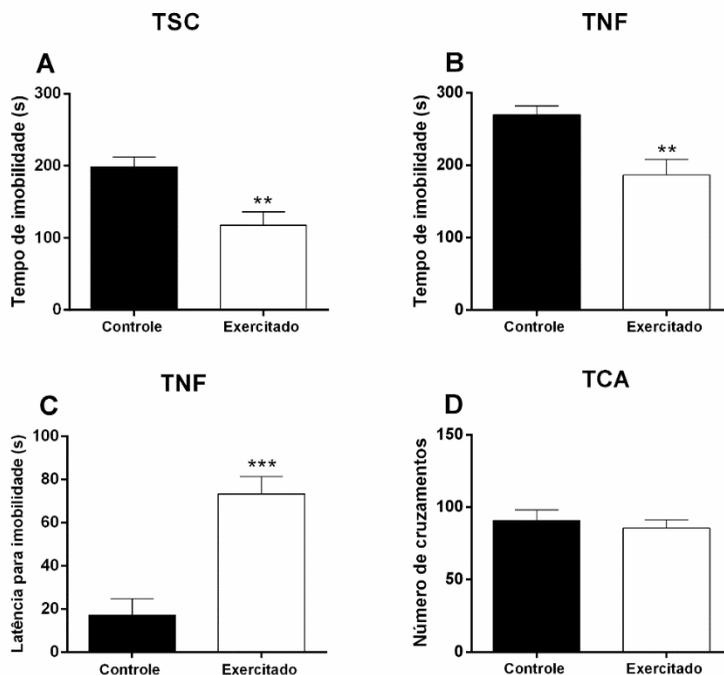
As diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste t de Student não pareado ou por análise de ANOVA seguidas pelo teste *post-hoc* de Tukey quando apropriado. Os resultados foram expressos em média + erro padrão da média (E.P.M.). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas usando o software Graph-Pad Prism 6.0 (San Diego, CA, USA).

### 4. 3 RESULTADOS

#### 4.3.1 Efeito do exercício físico de *endurance* no comportamento de camundongos submetidos ao TSC, TNF e TCA

O efeito do exercício físico de *endurance* no tempo de imobilidade no TSC e TNF e atividade locomotora em camundongos estão representados na **Figura 14**. O teste t de Student revelou que o protocolo de exercícios físicos reduziu o tempo de imobilidade no TSC ( $t = 3,46$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,01$ , **Figura 14A**) em camundongos quando comparados ao grupo controle. Além disso, o exercício físico aumentou significativamente a latência para imobilidade ( $t = 5,04$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 14C**) e diminuiu o tempo de imobilidade ( $t = 3,39$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,01$ , **Figura 14B**) no TNF. O protocolo de exercícios não alterou o número de cruzamentos no TCA ( $t = 0,55$ ,  $df = 14$ ,  $p = 0,48$ , **Figura 14D**), indicando que o efeito tipo-antidepressivo observado no TSC e no TNF ocorreu independente de qualquer alteração locomotora geral.

Figura 14. Efeito do exercício físico de *endurance* no TSC, TNF e TCA.



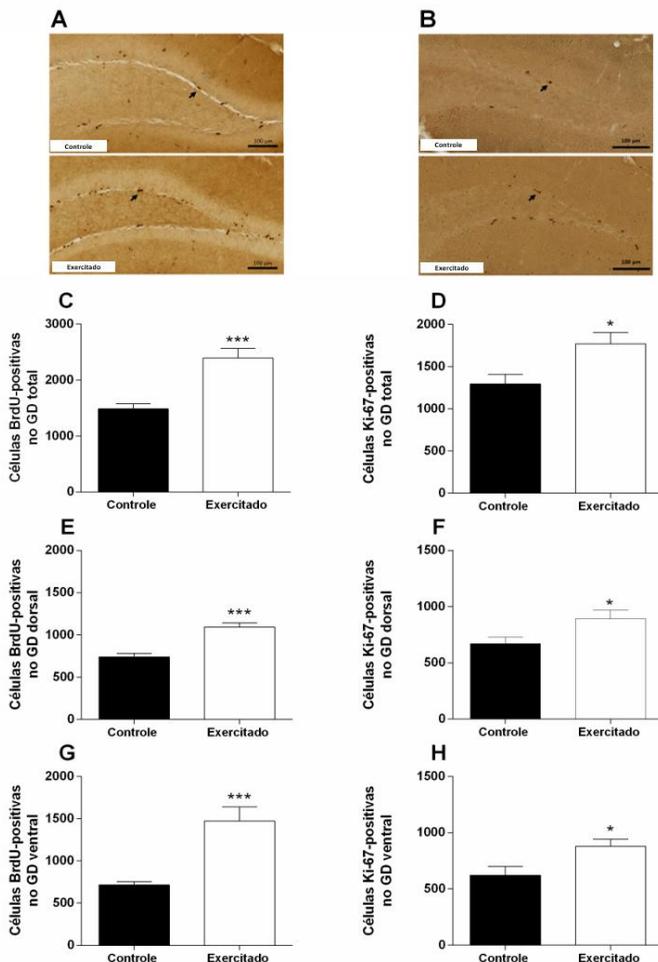
Legenda: Imobilidade no TSC (A), TNF (B), a latência para o primeiro episódio de imobilidade no TNF está representada em (C) e a atividade locomotora no TCA (número de cruzamentos) (D). Os dados são representados em média + E.P.M. (8 camundongos/grupo) e os resultados foram analisados com teste t de Student. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo controle.

#### 4.3.2 Efeito do exercício físico de *endurance* na proliferação celular no GD hipocampal

Para avaliar o efeito do protocolo de exercício físico de *endurance* na proliferação celular animais exercitados e controles receberam injeções de BrdU (100 mg/kg, i.p.) a cada 12 horas por 3 dias consecutivos antes do sacrifício. Subsequentemente seus cérebros foram processados para imuno-histoquímica com o marcador BrdU. O exercício físico de *endurance* aumentou significativamente o número de células BrdU-positivas presentes ao longo da ZSG do GD hipocampal total quando comparados ao grupo controle ( $t = 4,69$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ ,

**Figura 15C**). Ainda, a proliferação celular nas porções ventral e dorsal do GD hipocampal foram analisados individualmente. O exercício físico aumentou significativamente o número de células positivas no GD dorsal ( $t = 5,57$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 15E**) e no GD ventral ( $t = 4,47$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 15G**) do hipocampo. Além disso, foi avaliada a proliferação celular através de imuno-histoquímica contra Ki-67. O teste t de Student revelou um efeito significativo em células Ki-67-positivas na ZSG do GD hipocampal ( $t = 2,72$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,05$ , **Figura 15D**). Ao avaliar as porções dorsal e ventral separadamente, foi encontrado um efeito positivo nas células Ki-67-positivas em ambas porções dorsal ( $t = 2,24$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,05$ , **Figura 15F**) e ventral ( $t = 2,56$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,05$ , **Figura 15H**) do GD hipocampal.

Figura 15. Efeito do exercício físico de *endurance* na proliferação celular na ZSG do GD total, dorsal e ventral do hipocampo.

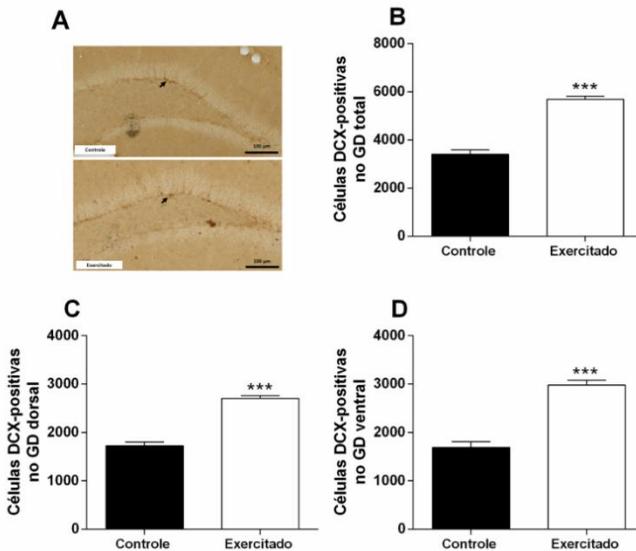


Legenda: O gráfico representa células BrdU-positivas (C, E e G) e Ki-67-positivas (D, F e H) no GD hipocampal total (C, D), no GD dorsal (E, F), e GD ventral (G, H). Os dados estão representados como média + E.P.M. Os resultados foram analisados através do teste t de Student. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o grupo controle. Fotomicrografia representativa dos efeitos do exercício físico na expressão do marcador exógeno BrdU (A) e endógeno Ki-67 (B) no GD hipocampal de camundongos exercitados e controles (não-exercitado) (Barra de escala = 100  $\mu$ m). As flechas indicam células imuno-positivas para BrdU (A) ou Ki-67 (B).

### 4.3.3 Efeito do exercício físico de *endurance* na diferenciação neuronal no GD hipocampal

Para avaliar os efeitos do exercício físico na diferenciação neuronal no hipocampo foi realizado a imuno-histoquímica contra DCX. O protocolo de exercício físico aumentou significativamente o número total de células DCX-positivas ao longo do GD total ( $t = 10,48$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 16B**). Encontramos resultados similares na sub-região dorsal ( $t = 10,51$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 16C**) e ventral ( $t = 8,40$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 16D**) do GD hipocampal, mostrando um aumento significativo em células DCX-positivas de camundongos exercitados quando comparados ao grupo controle.

Figura 16 Efeito do exercício físico de *endurance* na diferenciação neuronal no GD total, dorsal e ventral do hipocampo.

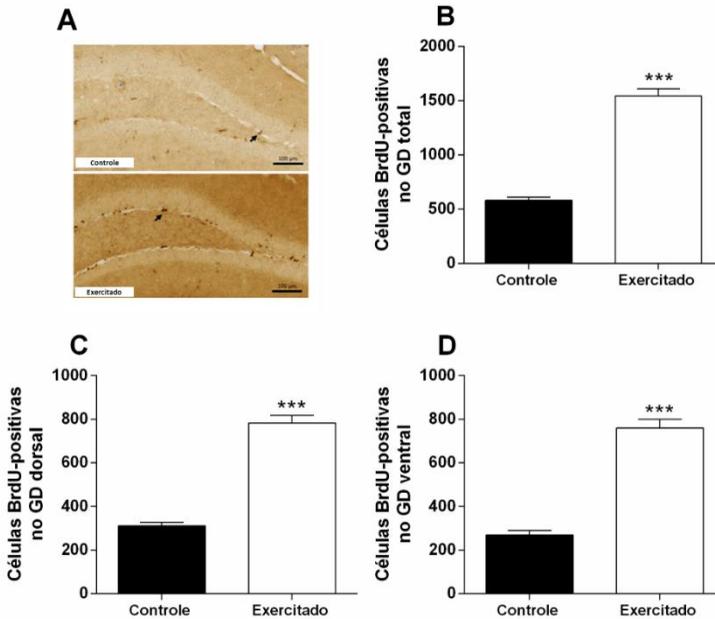


Legenda: Foi realizado o ensaio de imuno-histoquímica contra o marcador de neurônios imaturos DCX no GD hipocampal total (B), no GD dorsal (C) e no GD ventral (D). Os dados estão representados em média + E.P.M. e os resultados foram analisados através do teste t de Student. \*\*\* $p < 0,001$  quando comparado com o grupo controle. (A) Fotomicrografia representativa dos efeitos do exercício físico na expressão de DCX no GD hipocampal de camundongos controles (não-exercitado) e exercitados (Barra de escala = 100 μm). As flechas no painel A indicam células imuno-positivas para DCX.

#### 4.3.4 Efeito do exercício físico de *endurance* na sobrevivência celular do GD hipocampal

O efeito no exercício físico na sobrevivência de células geradas no GD hipocampal foi mensurado. Um grupo independente de camundongos recebeu injeções de BrdU (100 mg/kg, i.p.) de 12 em 12 horas por três dias consecutivos antes do início do protocolo de exercícios físicos. Vinte e oito dias após os camundongos controles e exercitados foram sacrificados e seus cérebros foram processados para o ensaio de imuno-histoquímica contra BrdU, com o intuito de determinar o número de novas células geradas (com o BrdU incorporado) que sobreviveram no período de 28 dias (tempo necessário para a maturação e integração neuronal) (MING; SONG, 2005). Ocorreu um aumento significativo de células BrdU-positivas ao longo do GD hipocampal inteiro em camundongos exercitados quando comparados com o grupo controle ( $t = 13,00$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 17A**). Corroborando com os resultados encontrados na proliferação celular e diferenciação neuronal, o aumento significativo na sobrevivência de novas células geradas marcadas com BrdU foi observado em ambas porções dorsal ( $t = 12,14$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 17C**) e ventral ( $t = 10,88$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 17D**) do GD hipocampal de camundongos.

Figure 17 Efeito do exercício físico de *endurance* na sobrevivência de novas células geradas no GD total, dorsal e ventral do hipocampo.



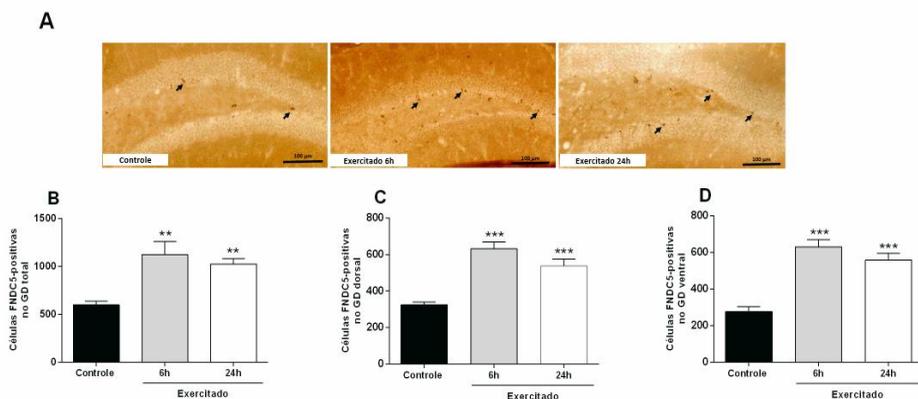
Legenda: Imuno-histoquímica contra BrdU no GD total (B), no GD dorsal (C) e GD ventral (D). Os dados representam a média + E.P.M. e os resultados foram analisados com o teste t de Student. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados ao grupo controle. (A) Fotomicrografia representativa dos efeitos do exercício físico na expressão de BrdU no GD hipocampal de camundongos controles (não-exercitado) e exercitados (Barra de escala = 100 μm). As flechas indicam células imuno-positivas para BrdU.

#### 4.3.5 Efeito do exercício físico de *endurance* na expressão do fragmento C-terminal de FNDC5 no GD hipocampal

Com intuito de investigar os efeitos do exercício físico de *endurance* no número de células que expressaram o fragmento C-terminal de FNDC5 em todo o ZSG do GD do hipocampo, os camundongos foram sacrificados 6 ou 24 horas após a conclusão do protocolo de exercício de *endurance* e fatias cerebrais foram então processadas para ensaio imuno-histoquímica contra o fragmento C-terminal de FNDC5. A ANOVA de uma via revelou um aumento

significativo do exercício físico em células positivas para o fragmento C-terminal de FNDC5 em todo o GD hipocampal [F (2, 18) = 10,44, **Figura 18B**], bem como nas porções dorsal [F (2, 18) = 23,10, **Figura 18C**] e ventral [F (2, 18) = 29,44, **Figura 18D**] do GD do hipocampo. Além disso, a análise *post-hoc* revelou um aumento significativo no número de células positivas para o fragmento C-terminal de FNDC5 no GD hipocampal total ( $p < 0,01$ ), assim como nas porções dorsal ( $p < 0,001$ ) e ventral ( $p < 0,001$ ) do GD em camundongos exercitados em ambos os tempos avaliados (ou seja, 6 e 24 horas após o exercício físico), indicando que esse aumento que foi detectado em 6 horas após o exercício físico é mantido por pelo menos 24 horas.

Figura 18. Efeito do exercício físico de *endurance* no número de células positivas para o fragmento C-terminal de FNDC5 no GD total, dorsal e ventral do hipocampo.

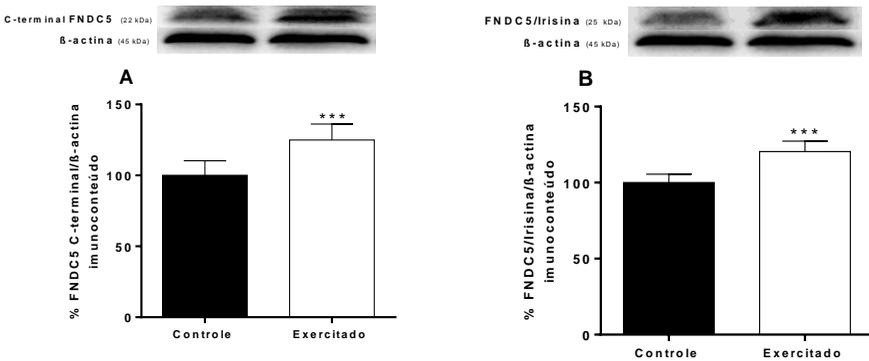


Legenda: Imuno-histoquímica contra o fragmento C-terminal de FNDC5 6 ou 24 horas após a última sessão de exercícios físicos no GD total do hipocampo (B), nas porções dorsal (C), e ventral (D) do GD. Os dados estão representados em média + E.P.M. e analisados através de ANOVA de uma via. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparados com o grupo controle (não exercitado). (A) Fotomicrografia representativa dos efeitos do exercício físico na expressão do fragmento C-terminal de FNDC5 no GD hipocampal de camundongos exercitados e controles (não-exercitado) (Barra de escala = 100  $\mu$ m). As flechas indicam células imuno-positivas para fragmento C-terminal de FNDC5.

### 4.3.6 Efeito do exercício físico de *endurance* no imunocontéudo do fragmento C-terminal de FNDC5 e de FNDC5/irisina

Os resultados descritos na **Figura 19** demonstram o imunocontéudo do fragmento C-terminal de FNDC5 e FNDC5/irisina em camundongos controles e exercitados 24 horas após a última sessão do protocolo de exercícios físicos. O teste t de Student mostrou que o exercício físico foi capaz de aumentar significativamente o imunocontéudo tanto do fragmento C-terminal de FNDC5 ( $t = 4,64$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 19A**) como de FNDC5/irisina ( $t = 6,56$ ,  $df = 14$ ,  $p < 0,001$ , **Figura 19B**) no hipocampo de camundongos exercitados quando comparados com seus respectivos controles.

Figure 19. Efeito do exercício físico de *endurance* no imunocontéudo de proteínas.



Legenda: Fragmento C-terminal de FNDC5 (A) e FNDC5/irisina (B) no hipocampo 24 horas após a última sessão de exercício físico de *endurance*. Os dados estão representados em média + E.P.M. e os resultados foram analisados através do teste t de Student. \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado com o grupo controle.

#### 4.4 DISCUSSÃO

Este segundo Capítulo teve por objetivo demonstrar que o protocolo de exercício físico de *endurance* promove o aumento da proliferação celular, diferenciação e sobrevivência neuronal hipocampal conforme previamente mostrado (INOUE et al., 2015; LOU et al., 2008; NOKIA et al., 2016; SO et al., 2017), ao mesmo tempo, estimulando um aumento nos níveis do fragmento C-terminal de FNDC5 e FNDC5/irisina no hipocampo. Assim, reforçamos dados da literatura a respeito do potencial tipo-antidepressivo do protocolo de exercício físico de *endurance* (DUMAN et al., 2008; KONDO et al., 2014; LEE; OHNO; OHTA; MIKAMI, 2013; MARLATT; LUCASSEN; VAN PRAAG, 2010).

É interessante observar que o efeito tipo-antidepressivo observado em camundongos submetidos ao exercício físico de *endurance* (4 semanas de treinamento em esteira) ocorreu tanto no TSC como no TNF. Este efeito tipo-antidepressivo foi independente de qualquer alteração locomotora, uma vez que, não houve alterações no TCA. O TSC e o TNF estão estabelecidos na literatura como testes usados para *screening* de agentes antidepressivos em estudos com animais, sendo responsivos a várias classes de antidepressivos clássicos, incluindo SSRIs, antidepressivos tricíclicos, e inibidores de monoamina oxidase (PORSOLT et al., 1979a; PORSOLT et al., 1979b; PORSOLT; PICHON; JALFRE, 1977; STERU et al., 1985).

Vale destacar que o efeito tipo-antidepressivo promovido pelo exercício físico pode diferir entre os estudos da literatura, dependendo do tipo, duração e intensidade do protocolo de exercícios físicos utilizado, bem como espécie ou sexo do animal. Considerando este cenário, um estudo prévio do nosso laboratório demonstrou que o exercício físico de roda de corrida voluntária durante 21 dias teve um efeito tipo-antidepressivo em camundongos *Swiss* machos submetidos ao TSC e TNF, enquanto o mesmo protocolo não apresentou efeito tipo-antidepressivo em 14 dias (CUNHA et al., 2013). De forma semelhante, Duman e colaboradores (2008) reportaram que camundongos C57/B16 expostos há 4 semanas de roda de corrida voluntária tiveram uma redução significativa de imobilidade nos TSC e TNF quando comparados a camundongos C57/B16 sujeitos a apenas uma semana do protocolo de roda proposto (DUMAN et al., 2008). Cabe mencionar que o sexo também influencia os efeitos positivos mediados pela prática de exercícios físicos tanto em roedores quanto em humanos. Por exemplo, 2 semanas de corrida em esteira aumenta a resiliência ao estresse em

camundongos fêmeas, enquanto que nos camundongos machos esse efeito positivo não foi observado (MUNIVE, SANTI; TORRES-ALEMAN, 2016). Um estudo em humanos mostrou que a prática de exercícios físicos aeróbios melhora a performance em tarefas cognitivas de memória dependente do hipocampo em mulheres (BARHA et al., 2017). No presente estudo somente camundongos fêmeas foram utilizadas e foi encontrada uma redução significativa de imobilidade nos TSC e TNF após 4 semanas de exercício físico de *endurance* (corrida em esteira). Dados da literatura reportam que a depressão é mais prevalente em mulheres do que em homens (BROMET et al., 2011; OTTE et al., 2016), assim, os resultados do presente estudo podem ter uma relevância clínica explorando o exercício físico de *endurance* como uma estratégia não-farmacológica para o tratamento de sintomas depressivos em mulheres. Evidencia-se que mais estudos são necessários para estabelecer qual o melhor protocolo de exercícios físicos para promover resultados no que diz respeito a redução do comportamento tipo-depressivo em camundongos e contribuição na remissão de sintomas em pacientes com diagnóstico de depressão.

De especial interesse, a resposta a diferentes protocolos de exercício físico está associada aos efeitos positivos observados em testes preditivos de ação antidepressiva e melhoras na neurogênese em camundongos. O protocolo de exercício físico moderado (20 m/min, 60 min,) ou intenso (1 minuto (30 m/min a 35 m/min) por 6 semanas, 3 dias por semana, reverteu a redução da neurogênese hipocampal adulta induzida pelo estresse crônico moderado, além de reduzir o tempo de imobilidade no TNF em camundongos (LEE et al., 2013). Em um modelo genético de depressão (ratos *Flinders*), a exposição a roda de corrida voluntária por 3 semanas aumentou o volume do hipocampo e o número de espinhos dendríticos no GD hipocampal (SIERAKOWIAK et al., 2015). Em contrapartida, o estudo de Ahmadalipour e Rashidy-Pour (2015), verificou ausência de efeito tipo-antidepressivo no TNF em ratos *Wistar*, treinados em esteira (40 min, 3 semanas, 2-8 m/minutos). Essa divergência de resultados comportamentais ressalta como cada protocolo pode influenciar diferentemente a plasticidade (AHMADALIPOUR; RASHIDY-POUR, 2015).

Várias linhas de evidências demonstram que a neurogênese hipocampal adulta é afetada em pacientes e em modelos animais de depressão (BOLDRINI et al., 2009; DRANOVSKY; HEN, 2006; KROGH et al., 2014; MILLER; HEN, 2015; PAZINI et al., 2017; SCHMAAL et al., 2016), enquanto drogas antidepressivas podem reverter este déficit (MALBERG et al., 2000; MANEV et al., 2001). A

neurogênese é um mecanismo essencial de plasticidade estrutural do cérebro de mamíferos adultos e já está estabelecido na literatura que existe um estímulo da neurogênese mediante a exposição a diferentes protocolos de exercício físico (PRAAG et al., 1999; PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999; VAN DER BORGHT, et al., 2007). Considerando este cenário, o exercício físico de *endurance* exerce um potente incremento na proliferação de células, na diferenciação neuronal e na sobrevivência celular hipocampal, quando comparados com exercícios físicos de força ou exercício físico intermitente (NOKIA et al., 2016). Ademais, 2 meses de roda de corrida voluntário resulta em um aumento no número de células DCX-positivas sendo que esta diferenciação neuronal aumentada parece estar correlacionada com um aumento no volume de substância cinzenta no hipocampo de ratos machos (BIEDERMANN et al., 2016). Além disso, o exercício físico de baixa ou moderada intensidade promove aumento da neurogênese hipocampal adulta em roedores machos (INOUE et al., 2015; LOU et al., 2008; NOKIA et al., 2016), enquanto o exercícios físicos de alta intensidade não foi capaz de promover o mesmo efeito (INOUE et al., 2015). No presente estudo 4 semanas de exercício físico de *endurance* realizado em esteira de corrida resultou num aumento significativo de proliferação celular (avaliada com BrdU e Ki-67), diferenciação neuronal (avaliada com DCX) e sobrevivência celular (avaliada com BrdU) ao longo de todo o GD hipocampal de camundongos fêmeas.

O GD do hipocampo pode ser dividido em sub-região dorsal e a sub-região ventral. Cada uma destas sub-regiões apresenta conexões distintas com diferentes regiões do cérebro, sendo, portanto, associadas a diferentes funções. Neste contexto, o aspecto dorsal do hipocampo (correspondente ao hipocampo posterior em primatas) foi associado primariamente com aprendizagem e memória (referente a cognição) enquanto o aspecto ventral (parte anterior do hipocampo de primatas) parece estar envolvido em regulação do humor e comportamentos afetivos relacionados à ansiedade e depressão (BANNERMAN et al., 2004; DEGROOT; TREIT, 2004; ENGIN; TREIT, 2007; MICHAEL, FANSELOW; DONG, 2010; PAZINI et al., 2017). Diante disso, a regulação diferenciada da neurogênese ao longo do eixo hipocampal dorso-ventral (septo-temporal) pode afetar diferencialmente a função de novas células nas regiões dorsal e ventral do GD hipocampal. Considerando estes aspectos, nosso estudo teve como objetivo avaliar se o exercício físico de *endurance* afeta o processo neurogênico nas porções dorsal e ventral do GD hipocampal. Desta forma, foram avaliadas a proliferação celular, diferenciação neuronal e sobrevivência

celular nestas porções. Em estudos prévios, Vivar et al. (2015) demonstraram que 30 dias do protocolo de roda de corrida voluntária aumentou a proliferação celular (mensurada com BrdU) no aspecto dorsal do GD hipocampal de camundongos machos (VIVAR et al., 2015). Em outro estudo, Gheorghe e colaboradores (2018) mostraram que 28 dias de roda de corrida voluntária aumentou a diferenciação neuronal no GD hipocampal em tanto em camundongos fêmeas como em machos, sendo que foi observado um aumento em células DCX-positivas no aspecto ventral do GD em machos, enquanto em fêmeas foi observado um aumento na porção dorsal do GD (GHEORGHE; QIU; GALEA, 2018). Assim, as discrepâncias entre os estudos podem ser atribuídas às diferenças entre as espécies e o sexo (fêmeas versus machos) dos camundongos utilizados, bem como as diferenças entre o tipo (corrida em esteira versus corrida voluntária), intensidade e duração dos protocolos de exercícios físicos empregados em cada estudo.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o aumento da capacidade neurogênica observado em todo o GD do hipocampo (em particular no aspecto ventral) contribua, pelo menos em parte, para o efeito tipo-antidepressivo observado após o protocolo de exercício físico de *endurance*. Entretanto, mais estudos são necessários para estabelecer uma clara relação causal entre efeito antidepressivo e neurogênese no protocolo de corrida em esteira. É importante destacar que o protocolo de roda de corrida voluntária foi capaz de reverter os prejuízos na neurogênese hipocampal causados pela administração crônica de corticosterona (modelo de estresse farmacológico) (LEE, et al., 2016). Por outro lado, o protocolo de roda de corrida voluntária não foi capaz de aumentar a sobrevivência de novas células no GD hipocampal de camundongos *knockout* para o receptor de serotonina, embora tenha aumentado o número de células DCX-positivas em camundongos selvagens (KONDO et al., 2014).

Embora um aumento na capacidade neurogênica hipocampal possa contribuir para o efeito tipo-antidepressivo do protocolo de exercício físico de *endurance* usado neste estudo, as vias de sinalização e os mecanismos moleculares que participam desses efeitos ainda não estão totalmente elucidados. Recentemente, moléculas (incluindo hormônios, citocinas, peptídeos e proteínas denominadas de miocinas) que são sintetizadas e liberadas na corrente sanguínea pela musculatura esquelética após a prática de exercícios físicos têm sido apontadas como as responsáveis por desempenhar um papel nos efeitos benéficos que o exercício físico tem sobre o cérebro (PEDERSEN, 2013; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012; SCHNYDER; HANDSCHIN, 2015; WRANN et al.,

2013; XIA et al., 2017). Uma destas moléculas é a irisina, uma proteína com 112 resíduos de aminoácidos que é derivada do FNDC5 (BOSTRÖM et al., 2012). Após a prática do exercício físico o ectodomínio extracelular do FNDC5 é clivado e glicosilado originando a irisina (BOSTRÖM et al., 2012; SCHUMACHER, et al., 2013) e recentes evidências sugerem que a irisina liberada pela musculatura é capaz de atravessar a BHE (PIYA et al., 2014; LOURENÇO et al., 2019). De fato, a irisina foi encontrada não somente em tecidos periféricos (incluindo o músculo, glândula parótica, língua e esôfago) (GÜR et al., 2018) como no sistema nervoso central. Sua presença foi relatada em neurônios e células gliais através da técnica de imunohistoquímica usando um anticorpo específico contra a irisina (AYDIN et al., 2014). Além disso, o precursor da irisina (FNDC5) também foi encontrado no fluido cerebrospinal (PIYA et al., 2014) e em uma população de neurônios cerebelares de Purkinje (DUN et al., 2013). Igualmente importante, alterações na expressão de FNDC5 nestes neurônios de Purkinje podem estar relacionadas à neurogênese cerebelar através de mecanismos que atualmente não são totalmente compreendidos (HASSANZADEH et al., 2018). No presente trabalho foi avaliado por imunohistoquímica o número de células expressando o fragmento C-terminal da proteína FNDC5 (precursor da irisina) na ZSG do GD hipocampal. Encontramos um aumento significativo no número de células positivas para o fragmento C-terminal de FNDC5 em toda a ZSG (tanto no GD dorsal quanto no GD ventral) em camundongos após 4 semanas do protocolo de exercícios físicos proposto. Um estudo *in vitro* prévio mostrou que FNDC5 facilita a diferenciação neuronal em células tronco embrionárias de ratos (FOROUZANFAR et al., 2015) e que a irisina regula de maneira dose dependente a proliferação celular em células H19-7 HN de ratos (MOON; DINCER; MANTZOROS, 2013). Além disso, a irisina confere neuroproteção em cultura de neurônios hipocampais no modelo da doença de Alzheimer (LOURENCO et al., 2018). Curiosamente, as concentrações plasmáticas de irisina foram encontradas aumentadas em ratos após 1 hora de exercícios em esteira de moderada intensidade, apresentando um pico 6 horas após a sessão de treinamento e reduzindo seus valores aos níveis do controle 24 horas após (PANG et al., 2018). O mesmo estudo mostrou que os níveis de FNDC5 no músculo gastrocnêmio dos camundongos permaneceu aumentado até 24 horas após a prática do exercício físico. Para nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a mostrar através de imunohistoquímica a presença do fragmento C-terminal de FNDC5 em células hipocampais

(especificamente no GD) de camundongos fêmeas após um protocolo de exercício físico de *endurance*. As células positivas para o fragmento C-terminal de FNDC5 foram aumentadas de forma significativa 6 horas após a última sessão de exercícios físicos e este aumento foi sustentado, mantendo-se até 24 horas após o término da sessão. Suportando estes resultados encontrados por imuno-histoquímica o presente trabalho encontrou um aumento no imunoconteúdo do fragmento C-terminal de FNDC5 e de FNDC5/irisina (mensurados através da técnica de *Western Blotting* com dois diferentes anticorpos) no hipocampo de camundongos que foram submetidos a este protocolo de exercício físico de *endurance*. A irisina aparentemente tem uma massa molecular de aproximadamente 22-32 kDa e esta variação nos resultados se deve a dimerização e/ou glicosilação (BOSTRÖM et al., 2012; LEE et al., 2014; WRANN et al., 2013), peso molecular este similar ao FNDC5 (ROCA-RIVADA et al., 2013; SCHUMACHER et al., 2013), tornando difícil discriminar entre estas duas proteínas em imunoenaios de amostras de tecidos nas quais FNDC5 e irisina estão presentes. Recentemente, Lourenço et al. (2019) mostraram através de imunodeteccção de proteínas e espectrometria de massa FNDC5/irisina presentes em múltiplas formas e com distintos pesos moleculares aparentes no cérebro, sugerindo que estas proteínas podem sofrer modificações pós-traducionais e / ou existir em diferentes estágios de agregação (LOURENCO et al., 2018). Além disso, a glicosilação tem sido proposta como um mecanismo para explicar mudanças na mobilidade eletroforética de FNDC5/irisina (BOSTRÖM et al., 2012; LEE et al., 2014). Corroborando com o estudo de Lourenço e colaboradores (2019), o presente trabalho optou por se referir a FNDC5/irisina ao descrever resultados baseados na deteccção de imunoenasiao de irisina em homogenatos de tecido cerebral (LOURENÇO et al., 2019).

A expressão de FNDC5 no cérebro (em especial no hipocampo) parece estar associada com vias de sinalização celular que envolvem o BDNF e o PGC-1 $\alpha$ . Além disso, camundongos PGC-1 $\alpha$  *-/-* apresentam uma redução na expressão de FNDC5 no cérebro (WRANN et al., 2013). De especial importância, o polimorfismo genético de BDNF, o BDNF<sup>Met/Met</sup> impede que o exercício físico aumente a expressão gênica de BDNF e FNDC5 no GD hipocampal (IERACI et al., 2016). A via PGC-1 $\alpha$ -FNDC5-BDNF também parece estar envolvida no efeito tipointidepressivo de FNDC5/irisina. Por exemplo, modular a via de sinalização PGC-1 $\alpha$ -FNDC5-BDNF no músculo promove resiliência em camundongos submetidos ao protocolo de estresse crônico de derrota social (CSDS) (ZHAN et al., 2018). Ressalta-se ainda os resultados

mostrados no Capítulo I desta tese que mostra que a injeção i.c.v. de irisina ou BDNF foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade no TSC (SITENESKI et al., 2018) assim a presente tese contribui com a literatura esclarecendo possíveis efeitos da irisina. De forma similar, a administração subcutânea de irisina preveniu o comportamento anedônico no teste de preferência por sacarose e o comportamento tipo-depressivo no TNF em ratos submetidos ao protocolo de estresse CUS (WANG; PAN, 2016). Considerando os dados apresentados no Capítulo II é razoável especular que o aumento dos níveis hipocâmpais do fragmento C-terminal de FNDC5 e de FNDC5/irisina pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo efeito pró-neurogênico e tipo-antidepressivo deste protocolo de exercício físico de *endurance*.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E FUTURAS PERSPECTIVAS

As conclusões deste trabalho denotam o potencial efeito tipo-antidepressivo da irisina, seja ela liberada de maneira endógena ou advinda exogenamente. A irisina administrada centralmente promoveu um efeito tipo-antidepressivo semelhante ao BDNF, uma molécula intimamente relacionada à depressão. Propomos que este efeito envolve a via de sinalização intracelular mediada pelos genes PGC1- $\alpha$ , FNDC5 e BDNF. Também é possível sugerir que o efeito tipo-antidepressivo e pró-neurogênico advindo do protocolo de exercício físico seja pelo menos em parte dependente da modulação de FNDC5/irisina. Estudos adicionais são, portanto, necessários para estabelecer uma relação causal entre esses efeitos relacionados à irisina. Digno de nota, nossos resultados destacam ainda mais os efeitos benéficos do exercício físico de *endurance* e sua potencial utilidade terapêutica como estratégia não-farmacológica para o tratamento da depressão. Além disso, o presente estudo fornece uma perspectiva preliminar e inovadora do potencial antidepressivo da irisina. Também demonstramos pela primeira vez na literatura o aumento de FNDC5 C-terminal (precursor da irisina) no GD hipocampal após um protocolo de exercício físico.

Em suma, a depressão é um transtorno de humor associado com altas taxas de morbidade e mortalidade, e apesar da existência de um número considerável de medicamentos para o tratamento da depressão, estes proporcionam uma efetividade para somente cerca de 50% dos indivíduos e geram inúmeros efeitos adversos. Assim, o exercício físico se consolidou na literatura como uma estratégia antidepressiva com capacidade de favorecer a remissão dos sintomas. Ressaltamos a importância de estudar os mecanismos moleculares e bioquímicos responsáveis por estes efeitos, bem como caracterizar o protocolo no que tange a intensidade, o volume e a frequência necessárias para produzir os benefícios.

A irisina é uma molécula promissora liberada após a prática de exercícios físicos e qualquer conhecimento adicional a respeito dela auxiliará na compreensão de seu papel no SNC. Desta forma, é importante questionar se: (i) A irisina encontrada no SNC vem da periferia ou é constitutiva deste sistema; (ii) Quais as células do SNC possuem a irisina na sua constituição e, em quais estruturas do SNC ela é expressa; (iii) Como ela atravessa a BHE e se existe um transportador/receptor; (iv) Quais são as vias de sinalização intracelular envolvidas nos efeitos da irisina; (v) Como ela participa da regulação de

sinapses hipocâmpais e em outras estruturas (vi) Qual a meia vida e como ocorre sua degradação.

Dando continuidade a este trabalho as perspectivas para esclarecer o potencial tipo-antidepressivo da irisina, seria possível sugerir:

- Estudar o efeito da administração de irisina por via i.p. ou i.c.v. em um modelo de depressão, como o modelo de corticosterona e/ou estresse crônico imprevisível.

- Verificar o efeito da administração de irisina na neurogênese hipocâmpal adulta realizando a co-marcação dos marcadores expressos nas distintas fases da neurogênese bem como do fragmento C-terminal de FNDC5.

- Avaliar as vias de sinalização intracelular envolvidas nos efeitos tipo-antidepressivo e pró-neurogênico da administração de irisina.

O Capítulo I da presente Tese originou o seguinte artigo:

SITENESKI, A.; CUNHA, MP.; LIEBERKNECHT, V.; PAZINI, FL.; GRUHN, K.; BROCARD, PS.; RODRIGUES ALS. Central irisin administration affords antidepressant-like effect and modulates neuroplasticity-related genes in the hippocampus and prefrontal cortex of mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. v. 84, p. 294-303, 2018.

O Capítulo II da presente Tese originou o seguinte artigo:

SITENESKI, A.; OLESCOWICZ, G.; PAZINI, FL.; CAMARGO, A.; FRAGA, DB.; BROCARD, PS.; GIL-MOHAPPEL, J.; CUNHA, MP.; RODRIGUES ALS. 2019. Antidepressant-like and pro-neurogenic effects of endurance physical exercise: The putative role of FNDC5/Irisin pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology*. Submitted.



## REFERÊNCIAS

AGUDELO, L. Z. et al. Skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. **Cell**, v. 159, n. 1, p. 33-45, 2014.

ALBRECHT, E. Irisin - a myth rather than an exercise-inducible myokine. **Scientific Reports**, n. 5, p. 8889, 2015.

ALLEN, A.; MESSIER, C. Plastic changes in the astrocyte GLUT1 glucose transporter and beta-tubulin microtubule protein following voluntary exercise in mice. **Behavioural Brain Research**, n. 240, p. 95-102, 2013.

AHMADALIPOUR, A.; RASHIDY-POUR A. Effects of treadmill running exercise during the adolescent period of life on behavioral deficits in juvenile rats induced by prenatal morphine exposure. **Physiology & Behavior**, v. 139, p. 26-33, 2015.

ATHERTON, P. J.; PHILLIPS, B. E. Greek goddess or Greek myth: the effects of exercise on irisin/FNDC5 in humans. **Journal of Physiology**, v. 591, n. 21, p. 5267-5268, 2013.

ALTMAN, J.; DAS, G. D. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. **Nature**, v. 207, n. 5000, p. 953-6, 1965.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M. Neurogenesis in adult subventricular zone. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 629-634, 2002.

AMELIA, J. et al. Adult Neurogenesis: Can Analysis of Cell Cycle Proteins Move Us “Beyond BrdU”? **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 147-165, 2007.

AIMONE, J. B. et al. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 991-1026, 2014.

APPLE D. M.; FONSECA R. S.; KOKOVAY, E. The role of adult neurogenesis in psychiatric and cognitive disorders. **Brain Research**, v. 1655, p. 270-276, 2017.

ASKARI, H. et al. A glance at the therapeutic potential of irisin against diseases involving inflammation, oxidative stress, and apoptosis: An introductory review. **Pharmacological Research**, v. 129, p. 44-55, 2018.

AYDIN, S. et al. A comprehensive immunohistochemical examination of the distribution of the fat-burning protein irisin in biological tissues. **Peptides**, v. 61, p. 130–136, 2014.

BAKER, J. S.; MCCORMICK, M. C.; ROBERGS, R. A. Interaction among skeletal muscle metabolic energy systems during intense exercise. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 2010, p. 1–13, 2010.

BAKER, L.D. et al., Effects of aerobic exercise on mild cognitive impairment: a controlled trial. **American Neurological Association**, v. 67, n. 1, p. 71-79, 2010.

BALL D. Metabolic and endocrine response to exercise: sympathoadrenal integration with skeletal muscle. **Journal Of Endocrinology**, v. 224, n. 2, p. R79-R95, 2015.

BANASR, M. et al. Agomelatine, a New Antidepressant, Induces Regional Changes in Hippocampal Neurogenesis. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 11, p. 1087–1096, 2006.

BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus - Memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 3, p. 273–283, 2004.

BARHA, C. K. et al. Sex differences in exercise efficacy to improve cognition: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in older humans. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 46, n. 4, p. 71–85, 2017.

BELVIRANLI, M. et al. The relationship between brain-derived neurotrophic factor, irisin and cognitive skills of endurance athletes.

**Physician and Sportsmedicine**, v. 44, n. 3, p. 290-296, 2016.

BERGAMI, M. et al. A critical period for experience-dependent remodeling of adult-born neuron connectivity. **Neuron**, v. 85, n. 4, p. 710-717, 2015.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: Beyond monoamines. **Nature Review Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 137-51, 2006.

BETTIO, L.E. et al. Guanosine prevents behavioral alterations in the forced swimming test and hippocampal oxidative damage induced by acute restraint stress. **Pharmacology Biochemistry Behaviour**, v. 127, p. 7-14, 2014.

BIEDERMANN, S. V. et al. The hippocampus and exercise: histological correlates of MR-detected volume changes. **Brain Structure and Function**, v. 221, n. 3, p. 1353–1363, 2016.

BJORKHOLM, C.; MONTEGGIA, L. M. BDNF - a key transducer of antidepressant effects. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 72-79, 2016.

BLANCO, C. et al. Epidemiology of major depression with atypical features: results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 73, n. 2, p. 224-232, 2012.

BOEKHOORN, K.; JOELS, M.; LUCASSEN, P. J. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. **Neurobiology of Disease**, v. 24, n. 1, p. 1-14, 2006.

BOGREN, M. et al. Gender differences in subtypes of depression by first incidence and age of onset: a follow-up of the Lundby population. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 268, n. 2, p. 179-189, 2017.

BOLANDZADEH, N. et al. Resistance Training and White Matter Lesion Progression in Older Women: Exploratory Analysis of a 12-Month Randomized Controlled Trial. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 63, n. 10, p. 2052-2060, 2015.

BOLDRINI, M. et al. Antidepressants increase neural progenitor cells in the human hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 11, p. 2376–2389, 2009.

BOLDRINI, M. et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 4, p. 589-599.e5, 2018.

BOSTRÖM, P. et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 463–468, 2012.

BRAUN, S. M.; JESSBERGER, S. Adult neurogenesis: mechanisms and functional significance. **Development**, v. 141, n. 10, p. 1983-1986, 2014.

BREMNER, J. D. et al. Reduced volume of orbitofrontal cortex in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 51, n. 4, p. 273-279, 2003.

BROMET, E. et al. Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode. **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, p. 90, 2011.

BROWN, J. P. et al. Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 467, n. 1, p. 1–10, 2003.

BRUEL-JUNGERMAN, E. et al. Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. **PLoS one.**, v. 4, n. 11, p. e7901, 2009.

BRUNELLO, N. et al. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 12, n. 5, p. 461–475, 2002.

BRUCHIM-SAMUEL, M. et al. Electrical stimulation of the vmPFC serves as a remote control to affect VTA activity and improve depressive-like behavior. **Experimental Neurology**, v. 283(Pt A), p. 255-263, 2016.

BUCHMAN, A. S. et al. Total daily physical activity and the risk of AD and cognitive decline in older adults. **Neurology**, v. 78, n. 17, p. 1323-1329, 2012.

CAO, L. et al. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. **Nature Genetics**, v. 36, n. 8, p. 827-835, 2004.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: Definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Reports**, v. 100, n. 2, p. 126-131, 1985.

CASTREN, E. Neurotrophic effects of antidepressant drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 4, n. 1, p. 58-64, 2004.

CHALDAKOV, G. The metabotropic NGF and BDNF: an emerging concept. **Archives Italiennes de Biologie**, v. 149, n. 2, p. 257-263, 2011.

CHAMARI, K.; PADULO, J. 'Aerobic' and 'Anaerobic' terms used in exercise physiology: a critical terminology reflection. **Sports Medicine - Open**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2015.

CHEN, M.; RUSSO-NEUSTADT, A. Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Brain research. Molecular brain research.**, v. 135, p. 181-193, 29 abr. 2005.

CHEN, M.; RUSSO-NEUSTADT, A. Running exercise-induced up-regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor is CREB-dependent. **Hippocampus**, v. 19, n. 10, p. 962-972, 2009.

CHESNEY, E.; GOODWIN, G. M.; FAZEL, S. Risks of all- cause and suicide mortality in mental disorders: A meta- review. **World Psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 153-160, 2014.

CHIAVAROLI, A. et al. . Effects of central fibroblast growth factor 21 and irisin in anxiety-like behavior. **Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents**, v. 31, n. 3, p. 797-802, 2017.

CHRISTIE, B. R.; CAMERON, H. A. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Hippocampus**, v. 16, n. 3, p. 199-207, 2006.

COOPER-KUHN, C. M.; GEORG KUHN, H. Is it all DNA repair? **Developmental Brain Research**, v. 134, n. 1–2, p. 13–21, 2002.

COTTER, D. et al. Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. **Cerebral Cortex**, v. 12, n. 4, p. 386–394, 2002.

COTMAN, C.; NIETO-SAMPEDRO, M. Cell biology of synaptic plasticity. **Science**, v. 225, n. 4668, p. 1287–1294, 1984.

COUILLARD-DESPRES, S. et al. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 2005.

COUILLARD-DESPRES, S. et al. Molecular mechanisms of neuronal migration disorders, quo vadis? **Current Molecular Medicine**, v. 1, n. 6, p. 677–688, 2001.

CUNHA, M. et al. Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway and Its Downstream Intracellular Targets in the Antidepressant-Like Effect of Creatine. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 5, p. 2954–2968, 2015.

CUNHA, M. P. et al. The antidepressant-like effect of physical activity on a voluntary running wheel. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 45, n. 5, p. 851–859, 2013.

CUNHA, M. P. et al. Subchronic administration of creatine produces antidepressant-like effect by modulating hippocampal signaling pathway mediated by FNDC5/BDNF/Akt in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 104, p. 78–87, 2018.

CUPPINI, R. et al. BDNF expression in rat skeletal muscle after acute or repeated exercise. **Archives italiennes de biologie.**, v. 145, n. 2, p. 99–110, 2007.

DANIELSON, N. B. et al. Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. **Neuron**, n. 1, v. 90, p. 101–112, 2016.

DEGROOT, A.; TREIT, D. Anxiety is functionally segregated within

the septo-hippocampal system. **Brain Research**, v. 1001, n. 1–2, p. 60–71, 2004.

DENNIS, C. V. et al. Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 42, n. 7, p. 621-638, 2016.

DRANOVSKY, A.; HEN, R. Hippocampal Neurogenesis: Regulation by Stress and Antidepressants. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1136–1143, 2006.

DREVETS, W. C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Current Opinion Neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 240-9, 2001.

DSM-V. DIAGNOSTIC AND STATISTICAL MANUAL OF MENTAL DISORDERS 5HT ED. **American Psychiatric Publishing**.

DU, H., et al. Dopaminergic inputs in the dentate gyrus direct the choice of memory encoding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 113, v.37, p. E5501-E5510, 2016.

DUMAN, C. H. et al. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. **Brain Research**, v. 1199, p. 148–158, 2008.

DUMAN, C. H.; DUMAN, R. S. Spine synapse remodeling in the pathophysiology and treatment of depression. **Neuroscience Letters**, v. 601, p. 20–29, 2015.

DUMAN, R. Pathophysiology of depression: The concept of synaptic plasticity I. **European Psychiatry**, v. 17, p. 306–310, 2002.

DUMAN, R. S. Novel therapeutic approaches beyond the serotonin receptor. **Biological Psychiatry**, v. 44, n. 5, p. 324–335, 1998.

DUMAN, R. S.; HENINGER, G. R.; NESTLER, E. J. A molecular and cellular theory of depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 54, n. 7, p. 597, 1997.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A Neurotrophic model for stress-related mood disorders. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1116–1127, 2006.

DUN, S. L. et al. . Irisin-immunoreactivity in neural and non-neural cells of the rodent. **Neuroscience**, v. 240, p. 155-62, 2013.

EGAN, M. F. et al. The BDNF val66met Polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and Hippocampal function. **Cell**, v. 112, n. 2, p. 257–269, 2003.

ENGESSER-CESAR, C.; ANDERSON, A. J.; COTMAN, C. W. Wheel running and fluoxetine antidepressant treatment have differential effects in the hippocampus and the spinal cord. **Neuroscience**, v. 144, n. 3, p. 1033–1044, 2007.

ENGIN, E.; TREIT, D. The role of hippocampus in anxiety: Intracerebral infusion studies. **Behavioural Pharmacology**, v. 18, n. 5–6, p. 365–374, 2007.

ERIKSSON, P. S. et al. . Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313-7, 1998.

ERICKSON, K. I. et al. Aerobic fitness is associated with hippocampal volume in elderly humans. **Hippocampus**, n. 10, p. 1030-1039, 2009.

ERICKSON, K. I. et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 7, n. 108, p. 3017–3022, 2011.

ERICKSON, K. I.; MILLER, D. L.; ROECKLEIN, K. A. The aging Hippocampus: Interactions between exercise, depression, and BDNF. **The Neuroscientist**, v. 18, n. 1, p. 82–97, 2011.

ETKIN, A. Functional neuroanatomy of anxiety: a neural circuit perspective. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, v. 2, p. 251-277, 2010.

EVERS-VAN GOGH, I. J. et al. Electric Pulse Stimulation of Myotubes as an In Vitro Exercise Model: Cell-Mediated and Non-Cell-Mediated Effects. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10944, 2015.

FABEL, K. et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. **The European journal of neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 2803–12, 2003.

FAIN, J.N., et al. Sacks, H.S. Exercise training does not increase muscle FNDC5 protein or mRNA expression in pigs. **Metabolism**, v. 62, n. 10, p. 1503-11, 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.

FANG, Z. H. et al. Effect of treadmill exercise on the BDNF-mediated pathway in the hippocampus of stressed rats. **Neuroscience Research**, v. 76, n. 4, p. 187–194, 2013.

FARIOLI-VECCHIOLI, S. Running rescues defective adult neurogenesis by shortening the length of the cell cycle of neural stem and progenitor cells. **Stem Cells**, v. 32, n. 7, p. 1968-1982, 2014.

FARKAS, E.; LUITEN, P. G. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 64, n. 6, p. 575-611, 2001.

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. 71-79, 2004.

FARSHBAF, J. et al. Does PGC1 $\alpha$ /FNDC5/BDNF elicit the beneficial effects of exercise on Neurodegenerative disorders? **Neuromolecular medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2015.

FERRER-MARTÍNEZ, A.; RUIZ-LOZANO, P.; CHIEN, K.R. Mouse PeP: a novel peroxisomal protein linked to myoblast differentiation and development. **Developmental Dynamics**, v. 224, n. 2, p. 154-167, 2002.

FOROUZANFAR, M. et al. Fndc5 overexpression facilitated neural differentiation of mouse embryonic stem cells. **Cell Biology International**, v. 39, n. 5, p. 629–637, 2015.

FRANKLIN, K. B. J. **Atlas The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. 3 ed, Else ed, 2008.

FREEMAN, M. R. Specification and morphogenesis of astrocytes. **Science**, v. 330, n. 6005, p. 774-778, 2010.

FUJIMURA, H. et al. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 87, n. 4, p. 728-734, 2002.

GAESSER, G.; POOLE, D. The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. **Exercise and sport sciences reviews**, v. 24, p. 35–71, 1996.

GAGE, F.H. Structural plasticity of the adult brain. **Dialogues Clinical Neuroscience**. v. 6, n. 2, p. 135-141, 2004.

GAJEWSKI, P.D.; FALKENSTEIN, M. Physical activity and neurocognitive functioning in aging - a condensed updated review. **European Review of Aging and Physical Activity**. p. 1-13, 2016.

GARBER, C. et al. American college of sports medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. **Medicine and science in sports and exercise.**, v. 43, n. 7, p. 1334–1359, 2011.

GE, S. et a. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. **Nature**, v. 439, n. 7076, p. 589-593, 2006.

GESCHWIND, D. H.; FLINT, J. Genetics and genomics of psychiatric disease. **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1489–1494, 2015.

GHEORGHE, A.; QIU, W.; GALEA, L. Hormonal Regulation of Hippocampal Neurogenesis: Implications for Depression and Exercise. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, 2018.

GIL-MOHAPEL, J. et al. Hippocampal Neurogenesis Levels Predict WATERMAZE Search Strategies in the Aging Brain. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–19, 2013.

GONÇALVES, J. T.; SCHAFFER, S. T.; GAGE, F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. **Cell**, v. 167, n. 4, p. 897–914, 2016.

GOODKIND, M. et al. Identification of a common Neurobiological substrate for mental illness. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 305, 2015.

GOTO, M. et al. . cDNA Cloning and mRNA analysis of PGC-1 in epitrochlearis muscle in swimming-exercised rats. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 274, n. 2, p. 350-354, 2000.

GRIGORYAN G, SEGAL M. Lasting Differential Effects on Plasticity Induced by Prenatal Stress in Dorsal and Ventral Hippocampus. **Neural Plasticity**, v. 2016 p. 2540462, 2016

GULYAEVA, N.V. Effects of stress factors on the functioning of the adult hippocampus: molecular-cellular mechanisms and the dorsoventral gradient. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 44, n. 9, p. 973–998, 2014.

GULYAEVA, N.V. Functional Neurochemistry of the Ventral and Dorsal Hippocampus: Stress, Depression, Dementia and Remote Hippocampal Damage. **Neurochemical Research**, doi: 10.1007/s11064-018-2662-0, 2018.

GULYAEVA, N.V. Ventral hippocampus, Stress and psychopathology: translational implications. **Neurochemical Journal**, v. 9, n. 2, p. 85–94, 2015.

GUR, F. M. et al. . Immunohistochemical localization of irisin in mole rats (*Spalax leucodon*). **Biotechnic & Histochemistry**, v. 92, n. 4, p. 245-251, 2017.

GÜR, F. M. et al. Identification of immunohistochemical localization of irisin in the dwarf hamster (*Phodopus roborovskii*) tissues. **Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, v.

47, n. 2, p. 174–179, 2018.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. **Journal of Comparative Psychology**, v. 22, n. 3, p. 345–352, 1936.

HALL, C. S. Emotional Behavior in the Rat. **Journal of comparative psychology**, v. 18, n. 5, p. 385–403, 1934.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463–9, 2008.

HASHEMI, M. S. et al. Fndc5 knockdown significantly decreased neural differentiation rate of mouse embryonic stem cells. **Neuroscience**, v. 231, p. 296-304, 2013.

HASKELL, W. L. et al. Physical activity and public health. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1423–1434, 2007.

HASSANZADEH, S. et al. FNDC5 expression in Purkinje neurons of adult male rats with acute spinal cord injury following treatment with methylprednisolone. **Neuropeptides**, v. 70, p. 16–25, 2018.

HAWLEY, J. et al. Integrative biology of exercise. **Cell.**, v. 159, n. 4, p. 738–749, 2014.

HILDEBRANDT et al. Gender differences in severity, symptomatology and distribution of melancholia in major depression. **Psychopathology**, v. 36, n. 4, p. 204-212, 2003.

HOFMANN, T. et al. The exercise-induced myokine irisin does not show an association with depressiveness, anxiety and perceived stress in obese women. **Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 67, n. 2, p. 195–203, 2016.

HOSHAW, B. A.; MALBERG, J. E.; LUCKI, I. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. **Brain Research**, v. 1037, n. 1-2, p. 204-8, 2005.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 677–736, 2001.

HUANG, T. et al. The effects of physical activity and exercise on brain-derived neurotrophic factor in healthy humans: A review. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 24, n. 1, p. 1–10, 2013.

HUH, J. Y. et al. FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. MRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise. **Metabolism**, v. 61, n. 12, p. 1725–1738, 2012.

HUH, J. Y. et al. Irisin stimulates muscle growth-related genes and regulates adipocyte differentiation and metabolism in humans. **International Journal of Obesity**, v. 38, n. 12, p. 1538–1544, 2014.

IERACI, A. et al. . Brain-Derived Neurotrophic Factor Val66Met Human Polymorphism Impairs the Beneficial Exercise-Induced Neurobiological Changes in Mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 13, p. 3070-3079, 2016.

INOUE, K. et al. Long-term mild, rather than intense, exercise enhances adult hippocampal neurogenesis and greatly changes the transcriptomic profile of the hippocampus. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–25, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS (IBGE). Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>>.

JAGASIA, R. et al. GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 25, p. 7966-7977, 2009.

JEDRYCHOWSKI, M. P. et al. Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 4, p. 734-740, 2015.

JIN, K. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 18, p. 11946-11950, 2002.

JUNG, M.W; MCNAUGHTON, B.L. Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. **Hippocampus**, v. 3, n. 2, p. 165-182, 1993.

KANG, et al. Decreased expression of synapse-related genes and loss of synapses in major depressive disorder. **Nature Medicine**, v. 18, n. 9, p. 1413–1417, 2012.

KEE, N. et al. The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 115, n. 1, p. 97-105, 2002.

KEMPERMANN, G. et al. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. **Cell Stem Cell**, v. 23, n. 1, p. 25-30, 2018.

KEMPERMANN, G. et al. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. **Trends in Neurosciences**, v. 27, n. 8, p. 447–452, 2004.

KEMPERMANN, G. Why new Neurons? Possible functions for adult Hippocampal Neurogenesis. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 635–638, 2002.

KEMPTON, M. J. et al. Structural Neuroimaging studies in Major Depressive disorder. **Archives of General Psychiatry**, v. 68, n. 7, p. 675–690, 2011.

KIM et al., Roles of myokines in exercise-induced improvement of neuropsychiatric function. **European Journal of Physiology**, doi: 10.1007/s00424-019-02253-8, 2019.

KNIERIM J. J. The hippocampus. **Current Biology**, v. 25, n. 23, p. R1116-1121, 2015.

KONDO, M. et al. The 5-HT<sub>3</sub> receptor is essential for exercise-induced hippocampal neurogenesis and antidepressant effects. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 11, p. 1428–1437, 2014.

KONG et al. Sex differences of gray matter morphology in cortico- limbic-striatal neural system in major depressive disorder. **Journal of Psychiatric Research**, v. 47, n. 6, p. 733-739, 2013.

KROGH, J. et al. The effect of exercise on hippocampal volume and neurotrophines in patients with major depression-A randomized clinical trial. **Journal of Affective Disorders**, v. 165, p. 24–30, 2014.

KUHN, H. G. et al. Detection and Phenotypic Characterization of Adult Neurogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. 8, n. 3, p. a025981, 2016.

KUHN, H. G.; DICKINSON-ANSON, H.; GAGE, F. H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 2027-2033, 1996.

KUPFER, D. J.; FRANK, E.; PHILLIPS, M. L. Major depressive disorder: New clinical, neurobiological, and treatment perspectives. **The Lancet**, v. 379, n. 9820, p. 1045–1055, 2012.

LABAKA, A. et al. Biological Sex Differences in Depression: A Systematic Review. **Biological Research For Nursing**, v. 20, n. 4, p. 383-392, 2018.

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

LEAL, R. B. et al. Lead-stimulated p38MAPK-Dependent Hsp27 Phosphorylation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 178, n. 1, p. 44–51, 2002.

LECKER, S. H. Expression of the irisin precursor FNDC5 in skeletal muscle correlates with aerobic exercise performance in patients with heart failure. **Circulation: Heart Failure**, v. 5, n. 6, p. 812-818, 2012.

LEE, H. et al. Regular Moderate or Intense Exercise Prevents Depression-Like Behavior without Change of Hippocampal Tryptophan Content in Chronically Tryptophan-Deficient and Stressed Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–8, 2013.

LEE, H.; THURET, S. Adult Human Hippocampal Neurogenesis: Controversy and **Evidence**. **Trends in Molecular Medicine**, v. 24, n. 6, p. 521-522, 2018.

LEE, J. C. Di et al. Voluntary wheel running reverses the decrease in subventricular zone neurogenesis caused by corticosterone. **Cell Transplantation**, v. 25, n. 11, p. 1979–1986, 2016.

LEE, P. et al. Irisin and FGF21 are cold-induced endocrine activators of brown fat function in humans. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 302–309, 2014

LETT, H. et al. Depression as a risk factor for coronary artery disease: Evidence, mechanisms, and treatment. **Psychosomatic medicine**, v. 66, n. 3, p. 305–315, 2004.

LEWIN, G. R.; BARDE, Y.-A. Physiology of the Neurotrophins. **Annual Review of Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 289–317, 1996.

LI, D. J. et al. The novel exercise-induced hormone irisin protects against neuronal injury via activation of the Akt and ERK1/2 signaling pathways and contributes to the neuroprotection of physical exercise in cerebral ischemia. **Metabolism**, v. 68, p. 31-42, 2017.

LI, J. et al. Increased astrocyte proliferation in rats after running exercise. **Neuroscience Letters**, v. 386, n. 3, p. 160-164, 2005.

LI, M.; D'ARCY, C.; MENG, X. Maltreatment in childhood substantially increases the risk of adult depression and anxiety in prospective cohort studies: Systematic review, meta-analysis, and proportional attributable fractions. **Psychological Medicine**, v. 46, n. 04, p. 717–730, 2015.

LIEM, R. S.; BROUWER, N.; COPRAY, J. C. Ultrastructural localisation of intramuscular expression of BDNF mRNA by silver-gold intensified non-radioactive in situ hybridisation. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 116, n. 6, p. 545-551, 2001.

LIM, L. W. et al. The antidepressant effects of ventromedial prefrontal cortex stimulation is associated with neural activation in the medial part

of the subthalamic nucleus. **Behavioral Brain Research**, v. 15, n. 279, p 17-21, 2015.

LIMBRICK-OLDFIELD, E. H.; VAN HOLST, R. J.; CLARK, L. Fronto-striatal dysregulation in drug addiction and pathological gambling: Consistent inconsistencies? **Neuroimage Clinical**, v. 2, p. 385-393, 2013.

LINDWALL, M. et al. Depression and exercise in elderly men and women: Findings from the Swedish national study on aging and care. **Journal of aging and physical activity**, v. 15, n. 1, p. 41–55, 2007.

LIU, J. J. et al. Lower circulating irisin is associated with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Diabetes and Its Complications**, v. 27, n. 4, p. 365-369, 2013.

LIU-AMBROSE, T. et al. Resistance training and executive functions: a 12-month randomized controlled trial. **Archives of internal medicine American Medical Association**, v. 170, n. 2, p.170-178, 2010.

LIU, Y. W. et al. Doublecortin expression in the normal and epileptic adult human brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 11, p. 2254-2265, 2008.

LOU, S. et al. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Research**, v. 1210, p. 48–55, 2008.

LOUET, J. et al. The coactivator PGC-1 is involved in the regulation of the liver carnitine palmitoyltransferase I gene expression by cAMP in combination with HNF4 alpha and cAMP-response element-binding protein (CREB). **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 41, p. 37991–8000, 2002.

LOURENCO, M. V. et al. Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. **Nature Medicine**, v. 25, n. 1, p. 165-175, 2018.

LOWRY, O. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 139, n. 1, p. 265–275, 1951.

LU, B.; PANG, P.; WOO, N. The yin and yang of neurotrophin action. **Nature reviews Neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 603–14, 2005.

LYTTLE, K. et al. Repeated fluvoxamine treatment recovers juvenile stress-induced morphological changes and depressive-like behavior in rats. **Brain Research**, v. 1616, p. 88-100, 2015.

MALBERG, J. E. et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 24, p. 9104–9110, 2000.

MANEV, H. et al. Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain in vivo and in neural cultures in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 411, n. 1–2, p. 67–70, 2001.

MARCUS et al. Gender differences in depression: findings from the STAR\*D study. **Journal of Affective Disorders**, v. 87, n. 2-3, p. 141-150, 2005.

MARCUS et al. Sex differences in depression symptoms in treatment-seeking adults: confirmatory analyses from the Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression study. **Comprehensive Psychiatry**, v. 49, n. 3, p. 238-246, 2008.

MARLATT, M. W.; LUCASSEN, P. J.; VAN PRAAG, H. Comparison of neurogenic effects of fluoxetine, duloxetine and running in mice. **Brain Research**, v. 1341, p. 93–99, 2010.

MATHEWS, K. J. et al. Evidence for reduced neurogenesis in the aging human hippocampus despite stable stem cell markers. **Aging Cell**, v. 16, n. 5, p. 1195-1199, 2017.

MATTHEWS, V. et al. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1409–1418, 2009.

McDONALD, H. Y.; WOJTOWICZ, J. M. Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. **Neuroscience Letters**, n. 385, v. 1, p. 70-75, 2005.

MCKINNON, M. C. et al. A meta-analysis examining clinical predictors of hippocampal volume in patients with major depressive disorder. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 34, n. 1, p. 41–54, 2009.

MICHAEL S. FANSELOW; HONG-WEI DONG. Are The Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, v. 65, n. 1, p. 1–25, 2010.

MILLER, B. R.; HEN, R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 30, p. 51–58, 2015.

MING, G.; SONG, H. Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 223–250, 2005.

MING, G. L.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. **Neuron**, v. 70, n. 4, p. 687-702, 2011.

MITTERSCHIFFTHALER, M. T. et al. Neural response to pleasant stimuli in anhedonia: an fMRI study. **Neuroreport**, v. 14, n. 2, p. 177–182, 2003.

MOON, H.; DINCER, F.; MANTZOROS, C. Pharmacological concentrations of irisin increase cell proliferation without influencing markers of neurite outgrowth and synaptogenesis in mouse H19-7 hippocampal cell lines. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 62, n. 8, p. 1131–1136, 2013.

MOWLA, S. et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 16, p. 12660–12666, 2001.

MUNIVE, V.; SANTI, A.; TORRES-ALEMAN, I. A Concerted Action of Estradiol and Insulin Like Growth Factor I Underlies Sex Differences in Mood Regulation by Exercise. **Scientific Reports**, v. 6, n. 5, p. 1–10, 2016.

MURA, G. et al. Exercise as an add-on strategy for the treatment of major depressive disorder: A systematic review. **CNS Spectrums**, v. 19, n. 6, p. 496–508, 2014.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE. **Your guide to physical activity and your heart**, 2006, U.S. 2 Department of Health and Human Services. Disponível em: <[https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/public/heart/phy\\_active.pdf](https://www.nhlbi.nih.gov/files/docs/public/heart/phy_active.pdf)>. Acesso em: 19 fev. 2017.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. **Neuron**, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002

NEIS, V.B. et al. Acute agmatine administration, similar to ketamine, reverses depressive-like behavior induced by chronic unpredictable stress in mice. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 150-151, p. 108–114, 2016.

NICIU, M. J. et al. Second messenger/signal transduction pathways in major mood disorders: moving from membrane to mechanism of action, part I: major depressive disorder. **CNS Spectrums**, v. 18, n. 5, p. 231–241, 2013.

NOKIA, M. S. et al. Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. **Journal of Physiology**, v. 594, n. 7, p. 1855–1873, 2016.

NORHEIM, F. et al. The effects of acute and chronic exercise on PGC-1 $\alpha$ , irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. **FEBS Journal**, v. 281, n. 3, p. 739-749, 2014.

MOUSAVI, K.; JASMIN, B. J. BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 21, p. 5739-5749, 2006.

O'LEARY O. F; CRYAN, J. F. A ventral view on antidepressant action: roles for adult hippocampal neurogenesis along the dorsoventral axis. **Trends in Pharmacological Sciences**, n. 35, v. 12, p. 675-687, 2014.

ONGÜR, D.; DREVETS, W. C; PRICE, J. L. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. **Proceedings of the**

**National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 22, p. 13290-13295, 1998.

ONGÜR, D; PRICE, J. L. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. **Cerebral Cortex**, v. 10, n. 3, p. 206-219, 2000.

OTTE, C. et al. Major depressive disorder. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 16065, p. 1–20, 2016.

PALAZIDOU, E. The neurobiology of depression. **British Medical Bulletin**, v. 101, p. 127–145, 2012.

PALMER, T. D.; WILLHOITE, A. R.; GAGE, F. H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 425, n. 4, p. 479-494, 2000.

PALMER, T. D. et al. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. **Nature**, v. 411, n. 6833, p. 42-43, 2001.

PAN, W. et al. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 37, n. 12, p. 1553-1561, 1998.

PANATIER, A.; ARIZONO, M.; NÄGERL, U. V. Dissecting tripartite synapses with STED microscopy. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 369, n. 1654, p. 20130597, 2014.

PANG, M. et al. Time-Dependent Changes in Increased Levels of Plasma Irisin and Muscle PGC-1 $\alpha$  and FNDC5 after Exercise in Mice. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 244, n. 2, p. 93–103, 2018.

PANG, P. et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 306, n. 5695, p. 487–491, 2004.

PAPP, C. et al. . Alteration of the irisin-brain-derived neurotrophic factor axis contributes to disturbance of mood in COPD patients. **International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 12, p. 2023-2033, 2017.

PAXINOS, W. K. *The Brain: An Introduction to Functional Neuroanatomy*. **1 ed. Elsevier**, San Diego, CA.: 2010.

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

PEDERSEN, B. K. Muscle as a secretory organ. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 3, p. 1337–1362, 2013.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 457–465, 2012.

PENNINX et al. Understanding the somatic consequences of depression: biological mechanisms and the role of depression symptom profile. **BMC Medicine**, v. 11, p. 129, 2013.

PERRATON, L.; KUMAR, S.; MACHOTKA, Z. Exercise parameters in the treatment of clinical depression: A systematic review of randomized controlled trials. **Journal of evaluation in clinical practice**, v. 16, n. 3, p. 597–604, 2009.

PETZINGER G. M. et al. Exercise-enhanced neuroplasticity targeting motor and cognitive circuitry in Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, v. 12, n. 7, p. 716-726, 2013.

PHILLIPS, C. et al. Neuroprotective effects of physical activity on the brain: A closer look at trophic factor signaling. **Frontiers in cellular neuroscience**. v. 8, p. 170, 2014.

PIATTI, V.C. et al. The timing for neuronal maturation in the adult hippocampus is modulated by local network activity. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 21, p. 7715-7728, 2011.

PICCINNI, A. et al. Plasma and serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients during 1 year of antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 105, n. 1-3, p. 279–283, 2008.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. **The Journal of physiology.**, v. 546, p. 851–858, 2003.

PIYA, M. et al. The identification of irisin in human cerebrospinal fluid: Influence of adiposity, metabolic markers, and gestational diabetes. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 306, n. 5, E512-E518, 2014.

POLLOCK, K. Exercise in treating depression: Broadening the psychotherapist's role. **Journal of clinical psychology**, v. 57, n. 11, p. 1289–300, 2001.

POPOLI, M. et al. Second messenger-regulated protein kinases in the brain: Their functional role and the action of antidepressant drugs. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 1, p. 21–33, 2000.

PORSOLT, R. D. et al. Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents. **European journal of pharmacology**, v. 57, n. 2–3, p. 201–210, 1979a.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 229, n. 2, p. 327-336, 1977.

PORSOLT, R. et al. Immobility induced by forced swimming in rats: Effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. **European journal of pharmacology.**, v. 57, p. 201–210, 1979b.

PORSOLT, R.; PICHON, M. Le; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730–732, 1977.

PRAAG, H. Van et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 23, p. 13427–13431, 1999.

PRAAG, H. VAN; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature America Inc**, v. 2, n. 3, p. 266–270, 1999.

PRAKASH, R. S. et al. Physical activity and cognitive vitality. **The Annual Review of Psychology**, v. 66, p. 769-797, 2015.

PRICE, J. L. Prefrontal cortical networks related to visceral function and mood. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 29, n. 877, p. 383-396, 1999.

QUINN, L. S. et al., Circulating irisin levels and muscle FNDC5 mRNA expression are independent of IL-15 levels in mice. **Endocrine**, v. 50, n. 2, p. 368-377, 2015.

RAJKOWSKA, G. et al. Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 45, n. 9, p. 1085-1098, 1999.

RANA, K. et al. Plasma irisin levels predict telomere length in healthy adults. **Age (Dordrecht, Netherlands)**, v. 36, n. 2, p. 995–1001, 2014.

RASMUSSEN, P. et al. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 10, p. 1062-1069, 2009.

RIMER, J. et al. Exercise for depression. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 7, p. CD004366, 2012.

RIQUELME, P. A.; DRAPEAU, E.; DOETSCH, F. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, v. 363, n. 1489, p. 123-137, 2008.

ROCA-RIVADA, A. et al. FNDC5/Irisin Is Not Only a Myokine but Also an Adipokine. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2013.

ROSSI, C. et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 7, p. 1850–1856, 2006.

SALEHI A, DELCROIX, J. D, MOBLEY, W. C. Traffic at the intersection of neurotrophic factor signaling and neurodegeneration. **Trends Neuroscience**, v. 26, n. 2, p. 73-80, 2003.

SANTARELLI, L. et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. **Science**, v. 301, n. 5634, p. 805–809, 2003.

SAPOLSKY, R. M. Glucocorticoids and Hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. **Archives of General Psychiatry**, v. 57, n. 10, p. 925, 2000.

SARTORI, C. et al. The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF, and proBDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. **Neuroscience**, v. 180, p. 9–18, 2011.

SAUR, et al. Physical exercise increases GFAP expression and induces morphological changes in hippocampal astrocytes. **Brain Structure & Function**, v. 219, n. 1, p. 293-302, 2014.

SCHMAAL, L. et al. . Subcortical brain alterations in major depressive disorder: findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 6, p. 806-812, 2016.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 12, p. 2378-2391, 2010.

SCHMIDT, H. D.; DUMAN, R. S. The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, antidepressant treatments and animal models of depressive-like behavior. **Behavioural Pharmacology**, v. 18, n. 5-6, p. 391–418, 2007.

SCHNYDER, S.; HANDSCHIN, C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 $\alpha$ , myokines and exercise. **Bone**, v. 80, n. 1, p. 115-125, 2015.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311–

322, 2000.

SCHUCH et al. Gender differences in major depressive disorder: results from the Netherlands study of depression and anxiety. **Journal of Affective Disorders**, v. 156, p. 156-163, 2014.

SCHUMACHER, M. A. et al. . The structure of irisin reveals a novel intersubunit  $\beta$ -sheet fibronectin type III (FNIII) dimer: implications for receptor activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 47, p. 33738-33744, 2013.

SEIFERT, T. et al. Endurance training enhances BDNF release from the human brain. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 2, p. R372-377, 2010.

SERI, B. et al. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 18, p. 7153-7160, 2001.

SHELINE, Y. et al. Treatment course with antidepressant therapy in late-life depression. **The American journal of psychiatry**, v. 169, n. 11, p. 1185–1193, 2013.

SHELTON, R. C. et al. Elevated 5-HT 2A receptors in postmortem prefrontal cortex in major depression is associated with reduced activity of protein kinase A. **Neuroscience**, v. 158, n. 4, p. 1406–1415, 2009.

SHIHABUDDIN, L. S. et al., Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 23, p. 8727-8735, 2000.

SHIRAYAMA, Y. et al. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 8, p. 3251- 3261, 2002.

SIDDIQUI, N.; NESSA, A.; HOSSAIN, M. Regular physical exercise: Way to healthy life. **Mymensingh medical journal: MMJ.**, v. 19, n. 1, p. 154–158, 2010.

SIERAKOWIAK, A. et al. Hippocampal Morphology in a Rat Model of

Depression: The Effects of Physical Activity. **The Open Neuroimaging Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2015.

SIRIANNI, R. W. et al. The behavioral and biochemical effects of BDNF containing polymers implanted in the hippocampus of rats. **Brain Research**, v. 1321, p. 40-50, 2010.

SITENESKI, A. et al. Central irisin administration affords antidepressant-like effect and modulates neuroplasticity-related genes in the hippocampus and prefrontal cortex of mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 84, n. Pt A, p. 294–303, 2018.

SO, J. H. et al. Intense Exercise Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis But Not Spatial Discrimination. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2017.

SOFI, F. et al. Physical activity and risk of cognitive decline: a meta-analysis of prospective studies. **Journal of Internal Medicine**, v. 269, n. 1, p. 107-117, 2011.

SORRELLS, S. F. et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. **Nature**, v. 555, n. 7696, p. 377-381, 2018.

SONG, H. J.; STEVENS, C. F; GAGE, F. H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 438-445, 2002.

SPALDING, K. L. et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. **Cell**. v. 153, n. 6, p. 1219-1227, 2013.

STANTON, R.; REABURN, P. Exercise and the treatment of depression: A review of the exercise program variables. **Journal of science and medicine in sport**, v. 17, n. 2, p. 177–82, 2013.

STEIB, K. et al., Mitochondria modify exercise-induced development of stem cell-derived neurons in the adult brain. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 19, p. 6624-6633, 2014.

STEINER B, et al. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. **Glia**, n. 54, v. 8, p. 805-814, 2006.

STEINER, J.L. et al. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain.

**Journal of Applied Physiology**, v. 111, n. 4, p. 1066-1071, 2011.

STENGEL, A. et al. Circulating levels of irisin in patients with anorexia nervosa and different stages of obesity--correlation with body mass index. **Peptides**, v. 39, p. 125-130, 2013.

STERU, L. et al. . The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367-370, 1985.

SVENNINGSSON, P. et al. Alterations in 5-HT1B receptor function by p11 in depression-like states. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5757, p. 77-80, 2006.

TALIAZ, D. et al. Knockdown of brain-derived neurotrophic factor in specific brain sites precipitates behaviors associated with depression and reduces neurogenesis. **Molecular Psychiatry**, v. 15, n. 1, p. 80-92, 2009.

TANTI, A; BELZUNG, C. Neurogenesis along the septo-temporal axis of the hippocampus: are depression and the action of antidepressants region-specific? **Neuroscience**, v. 12, n. 252 p. 234-252, 2013.

THARMARATNAM, T. et al. Exercise becomes brain: sustained aerobic exercise enhances hippocampal neurogenesis. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 1, p. 7-8, 2017.

TEKIN, S. et al. The effects of intracerebroventricular infusion of irisin on feeding behaviour in rats. **Neuroscience Letters**, v. 645, p. 25-32, 2017.

TEUFEL, A. et al. Frcp1 and Frcp2, two novel fibronectin type III repeat containing genes. **Gene.**, v. 297, p. 79-83, 2002.

the hippocampal granular layer. **Hippocampus**, n. 3, v. 2, p. 165-182, 1993.

TIANO, J. P.; SPRINGER, D. A.; RANE, S. G. SMAD3 negatively regulates serum irisin and skeletal muscle FNDC5 and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) during exercise. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 12, p. 7671-7684, 2015.

TIKHONOVA, M.; KULIKOV, A. V. Antidepressant-Like Effects of Central BDNF Administration in Mice of Antidepressant Sensitive Catalepsy (ASC) Strain. **The Chinese Journal of Physiology**, v. 55, n. 4, p. 284-293, 2012.

TSAI, S. The P11, tPA/plasminogen system and brain-derived neurotrophic factor: Implications for the pathogenesis of major depression and the therapeutic mechanism of antidepressants. **Medical hypotheses**, v. 68, n. 1, p. 180–183, 2006.

TSAI, S. The possible role of tissue-type plasminogen activator and the plasminogen system in the pathogenesis of major depression. **Medical hypotheses**, v. 66, n. 2, p. 319–322, 2005.

VALVASSORI, S. S. et al. . Intracerebral Administration of BDNF Protects Rat Brain Against Oxidative Stress Induced by Ouabain in an Animal Model of Mania. **Molecular Neurobiology**, v. 52, n. 1, p. 353-62, 2015.

VAN DER BORGHT, K. et al. Exercise Improves Memory Acquisition and Retrieval in the Y-Maze Task: Relationship With Hippocampal Neurogenesis. **Behavioral Neuroscience**, v. 121, n. 2, p. 324–334, 2007.

VAN PRAAG, H. et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1030-1034, 2002.

VIVAR, C. Adult Hippocampal Neurogenesis, Aging and Neurodegenerative Diseases: Possible Strategies to Prevent Cognitive Impairment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 21, p. 2175–2192, 2015.

VIVAR, C. et al. Monosynaptic inputs to new neurons in the dentate gyrus. **Nature Communications**, n. 3, v. 1107, 2012.

VOGEL, T. et al. Health benefits of physical activity in older patients: a review. **International Journal of Clinical Practice**, v. 63, n.2, p. 303-320, 2009.

VON BOHLENUND UND HALBACH, O. Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. **Cell and Tissue Research**, v. 329, n. 3, p. 409-420, 2007.

VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: A systematic analysis for the global burden of disease study 2013. **The Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 743–800, 2015.

VOSS, N. W. et al., Bridging animal and human models of exercise-induced brain plasticity. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 17, n. 10, p. 525-544, 2013.

WANG, S.; PAN, J. Irisin ameliorates depressive-like behaviors in rats by regulating energy metabolism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 474, n. 1, p. 22-28, 2016.

WANG, L. et al. The effects of antidepressant treatment on resting-state functional brain networks in patients with major depressive disorder. **Human Brain Mapping**, v. 36, n. 2, p. 768-778, 2015.

WARNER-SCHMIDT, J. et al. A role for p11 in the antidepressant action of brain-derived neurotrophic factor. **Biological psychiatry.**, v. 68, n. 6, p. 528–35, 2010.

WONG, M. L.; LICINIO, J. Research and treatment approaches to depression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 5, p. 343–351, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Dementia Fact Sheet. **Secondary World Health Organization**, Dementia Fact Sheet April 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/en/> acesso em:19/02/19.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Depression and Other Common Mental Disorders. **Global Health Estimates**, February, 2017. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?sequence=1> acesso em: 10/03/2019.

WRANN, C. D. et al. . Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 pathway. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 5, p. 649-659, 2013.

XIA, D. Y. et al. PGC-1 $\alpha$  or FNDC5 is involved in modulating the effects of A $\beta$ 1-42 oligomers on suppressing the expression of BDNF, a beneficial factor for inhibiting neuronal apoptosis, A $\beta$  deposition and cognitive decline of APP/PS1 Tg mice. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. 67, p. 1–10, 2017.

XU, B. BDNF (I)rising from exercise. **Cell metabolism**, v. 18, n. 5, p. 612–614, 2013.

ZACCHETTI, A. et al. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: comparison of KI-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. **Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 111, n. 3, p. 430-438, 2003.

ZHAN, G. et al. PGC-1 $\alpha$ –FNDC5–BDNF signaling pathway in skeletal muscle confers resilience to stress in mice subjected to chronic social defeat. **Psychopharmacology**, v. 235, n. 11, p. 3351–3358, 2018.

ZHANG, L. et al. The BDNF Val66Met Polymorphism interacts with maternal parenting influencing adolescent Depressive symptoms: Evidence of differential susceptibility model. **Journal of Youth and Adolescence**, v. 45, n. 3, p. 471–483, 2015a.

ZHANG, W. et al. Irisin: A myokine with locomotor activity. **Neuroscience Letters**, v. 595, p. 7–11, 2015b.

ZHANG, W. et al. Central and peripheral irisin differentially regulate blood pressure. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 29, n. 2, p. 121-127, 2015c.

ZHANG, Y. et al. Irisin stimulates browning of white Adipocytes through Mitogen-Activated protein Kinase p38 MAP Kinase and ERK MAP Kinase signaling. **Diabetes**, v. 63, n. 2, p. 514–525, 2013.

ZHAO, C. et al. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 3-11, 2006.

ZHAO, C. et al. Spine morphogenesis in newborn granule cells is differentially regulated in the outer and middle molecular layers. **Journal of Comparative Neurology**, v. 522, n. 12, p. 2756-2766, 2014.

ZHAO, C.; DENG, W; GAGE, F. H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 645-660, 2008.

ZHAO, S. et al. Improved expression of halorhodopsin for light-induced silencing of neuronal activity. **Brain Cell Biology**, n. 36, v. 1-4, p. 141-154, 2008.