



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LÍLIAN VANESSA DA PENHA GONÇALVES

**PODE A ULTRAMARATONA ASSOCIADA AO EXERCÍCIO DE ELEVADO
VOLUME INDUZIR METAPLASTICIDADE NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS?**

Recife
2024

LÍLIAN VANESSA DA PENHA GONÇALVES

**PODE A ULTRAMARATONA ASSOCIADA AO EXERCÍCIO DE ELEVADO
VOLUME INDUZIR METAPLASTICIDADE NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia. Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientador (a): Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa.

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Goncalves, Lilian Vanessa da Pena.

Pode a ultramaratona associada ao exercício de elevado volume induzir metaplasticidade no córtex cerebral de ratos? / Lilian Vanessa da Pena Goncalves. - Recife, 2024.

83f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia.

Orientação: Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa.

1. ultramaratona; 2. astrogliose; 3. córtex cerebral. I. Costa, Belmira Lara da Silveira Andrade da. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CDD 572

LÍLIAN VANESSA DA PENHA GONÇALVES

**PODE A ULTRAMARATONA ASSOCIADA AO EXERCÍCIO DE ELEVADO
VOLUME INDUZIR METAPLASTICIDADE NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS?**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira de Andrade da Costa
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Gisélia de Santana Muniz
Departamento de Nutrição - Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Matheus Santos de Souza Fernandes
Laboratório de imunopatologia Keizo Asami-LIKA

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes
Departamento de Nutrição - Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer primeiramente à Deus pela proteção, por sempre, sempre guiar meus passos e por permitir que a trilha do caminho que realmente me encanta seja tão firme. Caótica, por vezes, mas firme. Por ter me ajudado durante toda essa trajetória a re-centralizar meu olhar sobre mim mesma e sobre tudo que verdadeiramente é importante para mim. Muito grata por compreender que todos Seus planos para mim que são bem maiores que os meus próprios planos para mim.

À professora Belmira, que foi minha primeira referência do que acredito sobre o que é ciência. Muito do que sei, do que sou e do que me inspiro veio dessa mulher forte que inspira dedicação e comprometimento. Sempre muito disposta e questionadora, me ensinou uma lição gigante sobre vontade e paixão que tenho certeza de que nunca vou esquecer. A todos do Laboratório de Neurofisiologia, aos que me acompanharam e se foram, aos que chegaram e permaneceram. À Moara, que dividiu os choros. À Arthur, que me ajudou e me ajuda tanto, desde os experimentos até as crises durante os experimentos. Aprendi muito mais do que ensinei. A todos do departamento de fisiologia, à Seu Hilde, seu Edvaldo... todos que tanto me ajudaram e me levantaram nos dias difíceis. Até o cafezinho com manuê e fofoca antes do treinamento dos ratos tem um espaço importante no meu coração. À Melissa, Eli, profa. Dayane, prof. Leucio, agradeço a todo mundo que, de alguma forma, contribuiu para minha formação. Professores, técnicos, quem clareou minhas dúvidas, quem me ofereceu 2 minutos do seu tempo só para me ouvir.

Aos animais, que tiveram suas vidas destinadas em prol da ciência e que merecem ser lembrados pois sem eles, nada disso aqui poderia ter acontecido. Ao corpo docente e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Gisélia de Santana Muniz (UFPE), Dr. Matheus Santos de Souza Fernandes (LIKA), Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes (UFPE), Profa. Dra. Andreza de Bem (UnB), Prof. Dr. Filipe Silveira Duarte (UFPE), por terem aceitado o convite, para a análise e colaboração deste trabalho. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa.

À minha mãe, que é quem sempre esteve no apoio enquanto eu tento ganhar o mundo. Que é o motivo de toda vontade que habita no meu coração de vencer.

Como mulher, como mãe. Se ela resistiu e sobreviveu a tanto em nome de nós, eu sei que também consigo.

À minha família que também sempre foram apoio e nunca deixaram a peteca cair por mais que ela tenha tombado muito nos últimos anos. À Karolini e Mylenna, a quem sou eternamente grata por tanta troca, que me acompanham desde a graduação e em todos os sufocos de reconhecer o que é ser adulta. Agora eu consigo ver a importância que nosso ponto de apoio teve para chegar aonde todas nós chegamos. E sei que isso também nos acompanhará no que vem à frente. Obrigada tantas e tantas vezes por ajudar a dividir o peso! Quero agradecer mil vezes às minhas amigas, todas minhas irmãs do coração que dividem comigo uma imensa rede de apoio que faz com que eu me sinta confortável em ser o que sou, seja qual for o lugar. Que me escolheram e me escolhem todo dia quando me compreendem antes de apontar. Quando me escutam e me fazem de escuta. Viver essa troca me lembra do meu lugar de afeto, do meu lugar de escuta, a necessidade de se abraçar e a lembrança de não estar sozinha.

À Bruno Richard, que compartilha um coração cheio de amor e a vida comigo a tanto tempo. Que sempre cuida tão bem de mim nos dias que eu não consigo nem respirar longe do computador. Que sempre segurou minha mão e disse “vai dar certo!” nos dias difíceis. Que reduz o peso da rotina quando ela dói, porque só a gente sabe como dói. Que sempre foi e é casa pra mim. Que me enxerga além das máscaras que a gente usa depois da porta de casa. Sou muito grata por tudo que você faz e fez por mim, amo nosso companheirismo!

Dentre de todos os percalços do tempo que voa e da imprevisibilidade do que não está sob nosso controle, sinto que essa finalização é na verdade uma porta aberta cheia de possibilidades. Eu que sempre precisei me sentir segura em cada passo, sempre olhava para o futuro com a sede de quem espera alguém que não vê a muito tempo. Sempre com medo do que vinha, não sabia como ganhar.

Como escreveu Clarice, “*é que o tempo presente, como a luz de uma estrela, só depois é que me atingirá em anos luz...*”. Finalmente, depois desses dois apressados anos, consegui acalmar meu coração e largar mão do controle (tentar, e sigo tentando!). A vida pede que a gente corra, o tempo todo. Sempre senti o presente escorrendo pelas minhas mãos por não parar para observá-lo, mas no momento, não quero mais viver no passado. Quero reconhecer a riqueza do que o hoje me oferece. Todas as palavras aqui escritas resumem-se em um estado

sempre atual que eu chamo de “estou sendo”. E pela primeira vez, me sinto muito bem com o que estou sendo. O último dos agradecimentos é por todas as vezes em que achei que não conseguiria e não me permiti viver as coisas extraordinárias que a vida propõe por achar que eu mesma não dava conta, sempre “aperreada”, estressada e atrasada demais para enxergar que o que é nosso, já nos tem. Muito grata por não ter desistido.

“Eu sempre quis atingir um estado de paz e não de luta. Eu pensava que era o estado ideal. Mas acontece que – que sou eu sem a minha luta?”

“Se eu esperar compreender para aceitar as coisas –
nunca o ato de entrega se fará.
Tenho que dar o mergulho de uma só vez, mergulho que abrange a
compreensão e sobretudo a incompreensão.
E quem sou eu para ousar pensar? Devo é entregar-me.
Como se faz?
Sei, porém, que só andando é que se sabe andar
e – milagre – se anda.”
(LISPECTOR, C. 1973)

RESUMO

Corridas de ultra-maratona estão sendo procuradas por atletas em busca de uma melhora na performance e no condicionamento físico. Estudos indicam seus efeitos negativos em vários sistemas orgânicos, porém, pouco se sabe como a ultra-maratona e o treinamento prévio de elevado volume (EV) afetam a atividade do sistema nervoso central, em sua resposta antioxidante e na reatividade das células gliais. O presente estudo visa investigar mecanismos de balanço redox e de ativação astrocitária que envolvem a resposta do córtex cerebral ao EV e prova de exaustão (TE) que simula uma ultra-maratona. Quarenta e cinco ratos machos foram usados e distribuídos em 4 grupos. Um grupo (n=25) foi treinado em esteira motorizada, 5x/semana durante 12 semanas com duração até cerca de 90 min/dia, para configurar o EV. Após o fim do treinamento, 15 desses animais foram submetidos ao TE (EV-TE). O grupo controle (C) foi composto de animais que não treinaram, mas ficaram na esteira desligada. Em metade deles foi realizado o TE (CT-TE). Os ratos foram eutanasiados e homogenizados corticais foram obtidos para mensurar níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS), GSH, GSSG, óxido nítrico, IL1b, ERK e JNK1/2 total e fosforiladas. Foram também analisadas as atividades das enzimas SOD, CAT, NADPH oxidase e o perfil de isoformas proteicas de GFAP para avaliação das respostas astrocitárias. O treinamento de elevado volume aumentou as atividades da SOD e CAT e efeito aditivo do TE foi visto apenas no grupo CT na SOD, e entre os grupos com TE na CAT. A razão GSH/GSSG foi aumentada nos grupos EV e CT-TE em relação ao controle, enquanto os níveis de óxido nítrico foram reduzidos no grupo EV e CT-TE em relação ao controle, enquanto os níveis de óxido nítrico foram reduzidos no grupo EV; e aumentados no grupo CT-TE. Por outro lado, os níveis da IL-1b foram aumentados pelo EV, mas não afetados pelo TE em ambos os grupos. Os níveis totais de EROS aumentaram no grupo CT-TE mas não diferiram entre os demais grupos. Similaridade inter-grupo foi observada na atividade da NADPH oxidase. Os níveis de ERK fosforilada/ERK total foram reduzidos pelo EV mas não afetados pelo TE. Por outro lado, o teste de exaustão aumentou os níveis da JNK fosforilada e a razão pJNK/total-JNK em ambos os grupos CT-TE e EV-TE. Os níveis das isoformas proteicas de GFAP de 39, 45, 50 e 55kDa foram aumentados pelo elevado volume, mas revertidos aos valores do controle no grupo EV-TE. O córtex cerebral apresenta resiliência ao dano oxidativo

provocado pelo treinamento de alto volume o qual foi capaz de induzir aumento na atividade de enzimas antioxidantes, no balanço redox e redução nos níveis de NO. Redução nos níveis da p-ERK sem mudança na p-JNK ocorreu simultaneamente ao aumento na expressão proteica de todas as isoformas de GFAP. A maioria das respostas induzidas pelo treinamento são revertidas pelo TE, exceto o aumento na p-JNK2, sugerindo que mecanismos similares a metaplasticidade podem ser induzidas pela ultra-maratona.

Palavras-chave: ultramaratona, astrogliose; inflamação; exercício de elevado volume, atividade antioxidante

ABSTRACT

Ultra-marathon races are being sought after by athletes looking to improve performance and physical conditioning. Studies indicate their negative effects on several organic systems, however, little is known about how ultra-marathons and previous high volume training (EV) can affect the activity of the central nervous system, its antioxidant response and the reactivity of glial cells. The present study aims to investigate mechanisms of redox balance and astrocytic activation that involve the response of the cerebral cortex to EV and an exhaustion test (TE) that simulates an ultra-marathon. Forty-five male rats were used and distributed into 4 groups. One group (n=25) was trained on a motorized treadmill, 5x/week for 12 weeks with progressive duration up to approximately 90 min/day, to configure high volume (EV). After the end of this training, 15 of these animals were subjected to the ET (EV-TE). The control group (C) was composed of animals that did not train, but remained on the treadmill turned off. Half of them were also subjected to the TE (CT-TE) at the end of training. The rats were euthanized and cortical homogenates were obtained to measure levels of reactive oxygen species (ROS), GSH, GSSG, nitric oxide, IL1b, total and phosphorylated ERK1/2 and JNK1/2. The activity of the enzymes SOD, CAT, NADPH oxidase and the GFAP protein isoforms profile were also analyzed to evaluate astrocytic responses. High volume training increased SOD (p=0.0008) and CAT (p=0.0025) activities and an additive effect of TE was evident on CAT in the CT and EV groups, and on SOD in the CT group (p= 0,0211; p= 0.0001). The GSH/GSSG ratio was increased in the EV (p=0.0272) and CT-TE (p=0.0020) groups while nitric oxide levels were reduced in the EV (p<0.01) group; and increased in the CT-TE group (p<0.0001) but not in the EV-TE group. On the other hand, IL-1b levels were increased by EV but they were not affected by TE in both groups. Total ROS levels increased in the CT-TE group (p=0.0384) but did not differ between the other groups. Inter-group similarity was observed in NADPH oxidase activity. Phosphorylated ERK1/2/total ERK1/2 levels were reduced by EV (p=0.047) and not affected by TE. On the other hand, the TE increased the levels of phosphorylated JNK-2 (p=0.0002) and the p-JNK/total-JNK ratio in both the CT-TE and EV-TE groups (p= 0,0007; p<0.0001). The levels of GFAP protein isoforms of 39, 45, 50 and 55 KDa were increased by the EV but reverted to control values in the EV-TE group. The cerebral cortex was resilient to oxidative damage caused by EV

training, which was able to induce an increase in the activity of antioxidant enzymes, redox balance and a reduction in NO levels. Reduction in p-ERK levels without change in p-JNK occurred simultaneously with increased expression of all GFAP isoforms. Most training-induced responses were reversed by TE, except the increase in p-JNK2, suggesting that metaplasticity-like mechanisms can be induced by ultra-marathon.

Key words: ultra-endurance; astrogliosis; inflammation; high volume exercise, antioxidant activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Fluxo de informação molecular e celular que medeia a hormese em organismos e células	21
Figura 2 –	Resposta inflamatória aguda ao exercício extenuante	28
Figura 3 –	Resposta de enzimas antioxidantes importantes para a manutenção da homeostases para conter danos oxidativos e nitrosativos	35
Figura 4 –	Vias e fatores de transcrição envolvidos com a modulação gênica da molécula GFAP a partir de proteínas quinases	46
Figura 5 –	Filamentos intermediários encontrados nos astrócitos como vimentina, nestina e sinemina e as diferentes isoformas de GFAP já descobertas	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Homólogo 1 do oncogene viral do timoma murino V-AKT
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
cAMP	AMP cíclico
CaMKII	Cálcio calmodulina quinase II
CAT	Catalase
CDK5	Quinase 5 dependente de ciclina
cGMP	GMP cíclico
CREB2	Proteína de ligação ao DNA responsiva ao AMP cíclico
DAMPs	Padrões de reconhecimento de dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GO	Glutaciona oxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSH-Px	Glutaciona peroxidase
GSSG	Glutaciona oxidada
GP130	Glicoproteína 130
GR	Glutaciona redutase
H2O2	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIIT	Exercício intervalado de alta intensidade
HOO	Radical lipídico peroxil
IF	Filamentos intermediários
IFN- γ	Interferon gama
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL1-B	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
JAK2	Janus quinase 2
JNK	c-Jun-N-terminal-quinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LIF	Fator inibidor de leucemia
LPS	Lipopolissacarídeo
LTP	Potenciação de longo prazo
MAPK	MAP quinase
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NMDA	N-metil D-Aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOs	Óxido nítrico sintase
NRLP3	Proteína intracelular pertencente à família NLR envolvida no complexo multiproteico denominado inflamassoma.
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Radical hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAMPs	Padrões de reconhecimento de patógenos
PGC1-alfa	Coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PI3K	Fosfatidilinositol quinase 3
PKA	Proteína quinase A dependente de adenosina monofosfato cíclico
PKC	Proteína quinase C
PPAR γ	Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama
RFs	Fibras de Rosenthal
SOD	Superóxido dismutase
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
TLR	Receptores os receptores do tipo toll-like

Trx	Tioredoxina
TrxR	Tioredoxina redutase
TSP-1	Trombospondina 1
TSP-2	Trombospondina 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO COMO PROMOTOR DE EFEITOS SISTÊMICOS BENÉFICOS	216
2.2	EXERCÍCIO DE ELEVADO VOLUME E ULTRAMARATONAS	23
	2.2.1 <i>Desbalanço redox na ultramaratona</i>	24
	2.2.2 <i>Danos sistêmicos causados pelo exercício extenuante</i>	25
	2.2.3 <i>Exercício exaustivo na modulação do perfil inflamatório</i>	26
2.3	RESPOSTA ANTIOXIDANTE CEREBRAL AO DANO OXIDATIVO	30
2.4	ALTERAÇÕES NO SNC INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO FÍSICO E NEUROPLASTICIDADE.	36
2.5	VULNERABILIDADE NEURONAL SELETIVA E EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO	40
2.6	GFAP NA MODULAÇÃO DA FUNCIONALIDADE ASTROCITÁRIA	43
	2.6.1 <i>Exercício físico como modulador da expressão de GFAP</i>	47
3	OBJETIVOS	50
4	REFERÊNCIAS	51
5	ARTIGO (a ser submetido)	56
5.1	RESUMO	57
5.2	INTRODUÇÃO	58
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS	59
5.4	RESULTADOS	65
5.5	DISCUSSÃO	74
6	ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

Qual é o limite do esforço? A literatura exhibe que, mesmo em situações de extremo estresse, o corpo tende a homeostase e à adaptação. E talvez seja por isso que os treinamentos de alta intensidade e volume atraia tantos atletas e até curiosos. A ultramaratona é uma modalidade esportiva que vem sendo cada vez mais procurada por atletas e indivíduos em busca de desafios.

Uma corrida de ultramaratona é um evento de corrida com parâmetros de duração maiores que o comum. Ou seja, na ultramaratona, a distância da corrida (e, conseqüentemente, seu tempo) é muito mais longo do que a distância de uma corrida tradicional de maratona (JASTRZEBSKI et al., 2015). A intenção é favorecer a constância do indivíduo, que tende a correr numa intensidade moderada durante um longo tempo. Os resultados sistêmicos das ultramaratonas geralmente encontram um processo de fadiga fisiológica, ou “esgotamento” fisiológico, baseado na exaustão intensa que o indivíduo é submetido durante a prova. Dentro desses, o dano muscular e o acometimento renal são os principais envolvidos (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b). Há um estudo, inclusive, que indica que a redução de longevidade que envolve atletas de ultramaratona é semelhante em indivíduos sedentários (O'KEEFE et al., 2020), trazendo à tona questionamentos sobre como o treinamento aeróbico de moderada intensidade e elevada duração pode influenciar positivamente a qualidade de vida dos atletas pós ultramaratona.

Diversas vias, metabólicas ou fisiológicas, podem estar envolvidas com o processo de esgotamento fisiológico previamente citado, porém a alta demanda de energia que o exercício extenuante exige de vários sistemas orgânicos resulta em um colapso na função oxidativa. Esse colapso libera espécies reativas de oxigênio (EROS) na corrente sanguínea e ativa receptores envolvidos com o desencadeamento de processos inflamatórios. Poucos estudos se debruçam na compreensão desses efeitos ao nível do SNC, mas a vulnerabilidade do cérebro ao dano oxidativo pode estar envolvida com a fisiopatologia de diversas doenças (REN et al., 2017; WANG; MICHAELIS, 2010).

Um estudo realizado pelo grupo investigou as repercussões do treinamento aeróbico de moderada intensidade e elevado volume. Nele, viu-se que o treinamento físico em esteira durante 3 meses, em condições aeróbicas de moderada intensidade, mas elevado volume, induziu peroxidação lipídica no cerebelo, mas

também modulou o perfil de expressão de isoformas proteicas de GFAP, que é uma proteína estrutural astrocitária (DE SOUZA et al., 2020). O GFAP é um biomarcador de astrócitos reativos, ou seja, seus níveis elevam-se em situações em que o astrócito exerce seu perfil imune, respondendo a um dano. A esse processo, dá-se o nome de astrogliose (SOFRONIEW, 2020).

Considerando que: a) pouco se conhece a respeito dos acometimentos de extremos volumes de corrida nas células astrocitárias no SNC, de forma geral, b) há consideráveis questionamentos a respeito dos potenciais danos fisiológicos de ultra corridas para a saúde, c) a aplicação deste conhecimento tem relevância também na compreensão de mecanismos biomoleculares ligados a reatividade glial, o presente estudo tem a função de investigar a influência do exercício de elevado volume, com ou sem treinamento de exaustão, no perfil redox, inflamatório e astrocitário cortical.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBICO COMO PROMOTOR DE EFEITOS SISTÊMICOS BENÉFICOS

Muito visado para a análise de resposta a situações estressoras, o exercício físico é um exemplo perfeito de estímulo ambiental capaz de promover “hormese”. Hormese, (palavra de origem grega que significa “excitar”) é um termo usado na farmacologia, biologia e medicina para definir uma resposta adaptativa das células e organismos a doses reduzidas de estressores, capaz de gerar uma resistência nesse sistema ao processo danoso. Exemplos de tipos de hormese incluem a resposta adaptativa ao estresse ou restrição alimentar (MATTSON, 2008). Assim, como um indutor de hormese, o exercício físico de moderada ou alta intensidade promove uma adaptação plástica do organismo gerando uma demanda metabólica a ser cumprida e que pode ser adaptada e moldada. A figura 1 adaptada de Mattson (2008) ilustra o fluxo de informação molecular e celular que medeia a hormese em organismos e células.



Figura 1: Fluxo de informação molecular e celular que medeia a hormese em organismos e células. Adaptado de Mattson (2008).

Durante o exercício, é liberada uma grande quantidade de EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERNS), devido a intensificação da respiração celular. EROS são geradas pelo processo de formação de energia na cadeia respiratória e, quanto maior a demanda, maior a liberação destes radicais (HE et al., 2016).

Exercícios aeróbicos tem o oxigênio como principal fonte de energia para os músculos - estes também recebem o nome de exercício cardiorrespiratório, por utilizar o oxigênio captado pela respiração como principal suprimento de energia. Pelo contrário, o exercício anaeróbico consegue produzir energia através da fermentação láctica, utilizando a 19 glicose como fonte para a produção de lactato. Os parâmetros que definem os benefícios associados ao tipo de exercício incluem a intensidade e a duração deste (HE et al., 2016). Esses parâmetros definem se o mecanismo adaptativo associado ao dano causado é favorável ou não para a homeostase celular. Um exercício aeróbio de alta intensidade, por exemplo, tem uma demanda muito de oxigênio, o que pode resultar em uma sobrecarga mitocondrial. Estes, tendem a ocorrer com duração reduzida para que o músculo não inicie um processo de anaerobiose. Como exemplo, temos o treino intervalado de alta intensidade (HIIT) que vem sendo popularizado no treinamento cardiorrespiratório de atletas.

O exercício aeróbico em intensidade e volume moderados inicia uma quebra na homeostase metabólica através da liberação de EROS. Através disso, os níveis de algumas proteínas quinases são elevados e irão ativar o receptor PGC1-alfa, conhecido como o principal regulador da biogênese mitocondrial. Isso promove uma maior densidade mitocondrial (melhora quantitativa) e uma maior atividade enzimática mitocondrial (melhora qualitativa). Além disso, por si só, o exercício aeróbico aumenta a distribuição de fibras musculares de contração lenta e auxilia na irrigação da área pelo aumento da densidade de capilares, o que aumenta a produção de energia por meio de fosforilação oxidativa. Um dos efeitos disso é um sistema cardiovascular mais eficiente em levar oxigênio para o músculo (MANG et al., 2022).

A ativação de mecanismos de adaptação em exercícios de moderada intensidade e volume resulta em respostas benéficas como a elevação nos níveis de enzimas antioxidantes e a ativação de respostas pró-inflamatórias de recuperação ao dano (RADAK et al., 2013; POWERS et al., 2020; WANG et al., 2021). Todo esse processo ocorre de forma sistêmica, e os efeitos vão sendo percebidos fisiologicamente com o decorrer da prática física.

No caso do exercício de alta intensidade, além da liberação aumentada de EROS e ERNS pela maior necessidade energética, também há uma maior liberação de fatores pró-inflamatórios mesmo 24h após o exercício, exibindo uma modulação

no funcionamento do sistema imune que também pode gerar respostas mal adaptativas (GOMEZ-CABRERA et al., 2008). No entanto, recente evidência em humanos, utilizando a estimulação magnética transcraniana, demonstrou que o HIIT melhorou a plasticidade do córtex motor influenciando de forma mais acentuada os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e a indução da potenciação de longo prazo (LTP) do que o exercício moderado (ANDREWS et al., 2020).

2.2 EXERCÍCIO DE ELEVADO VOLUME E ULTRAMARATONA

A ultramaratona é caracterizada pela longa duração de corrida, maior do que 42.195 km (26.2 milhas), que é a quilometragem padrão de maratonas, podendo ser definida como uma competição com duração de 6h ou mais (JASTRZEBSKI et al., 2015). Por isso, o parâmetro volume está ligado ao tempo. Esse tipo de modalidade exige uma preparação prévia que envolve treinamentos de elevado volume prévios para facilitar a performance durante a corrida.

O treinamento aeróbico de alto volume prévio e constante é o foco entre os atletas praticantes de ultramaratona e favorece o aprendizado de técnicas de manutenção energética para serem utilizadas durante a corrida. As ultramaratonas de distâncias limitadas mais frequentes estão entre 50 km, 100 km, 50 milhas (80Km) e 100 milhas (160 Km) (JASTRZEBSKI et al., 2015). Existem também as que são limitadas pelo tempo podendo ocorrer dentro de 6h até 10 dias de duração. Algumas, inclusive, envolvem corridas de multi-estágios, atravessando países e até continentes. Estudos em humanos mostraram que treinamento de elevado volume e moderada intensidade promove alterações no perfil lipídico, em que alguns indicam o aumento e, outros, redução de HDL e a não-oxidação do LDL (WU et al., 2004; BENEDETTI et al., 2018; GÓRECKA et al., 2020).

De qualquer forma, a corrida de ultramaratona induz um perfil de estresse oxidativo, que envolve uma alta demanda de oxigênio bem como uma demanda energética, além de uma alta liberação de miocinas ocasionada pela indução do dano musculoesquelético, que é um dos principais fatores lesivos dos atletas deste tipo de corrida (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b). Mesmo com as dificuldades envolvidas em participar de uma ultramaratona, o número de ultramaratonistas vem crescendo ano após ano, sendo cada vez mais frequentada por não-atletas, ou seja, pessoas que correm de modo recreacional. Atletas podem se beneficiar pela

plasticidade induzida pelo exercício, que auxilia nas funções tróficas e protetoras. Maiores riscos ocorrem em indivíduos que participam de uma ultramaratona sem preparação física adequada (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b).

2.1.1 Desbalanço redox na ultramaratona

A manutenção da homeostasia energética é bem importante para a performance e a qualidade de vida dos ultramaratonistas. Altos volumes de corrida coexistem com um déficit energético elevado: isso pode fazer com que haja danos para a performance e saúde do indivíduo. Esse déficit energético ocorre também devido a associação do volume extenuante de corrida com a supressão do apetite, além dos problemas digestivos durante a corrida (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018^a; (CAMILETTI-MOIRÓN, et 21 al. 2013)). De qualquer forma, o resultado desse déficit é uma diminuição de massa corporal, onde se perde tanto massa gorda como massa magra e fluídos corporais. Quanto mais longa for a prova que o ultramaratonista for submetido, maior será o nível de déficit energético acompanhado de uma perda de massa corporal expressiva (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018a).

Durante um exercício intenso ou extenuante, há uma demanda contínua e intensa da produção de energia. Com isso, temos um grande influxo de oxigênio para mitocôndria das células do musculoesquelético, resultando em contínua produção de ATP bem como na liberação de EROS (MRAKIC-SPOSTA et al., 2015). As EROS podem ser definidas como compostos derivados do oxigênio, radicais ou não-radicais, que podem reagir rapidamente com componentes celulares, resultando em dano em proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e envolvendo-se em processos associados ao dano. Além disso, também podem serem sinalizadores e mensageiros celulares (MRAKIC-SPOSTA et al., 2015).

O oxigênio tem um alto potencial redox, atuando como aceptor de elétrons no processo de geração de energia metabólica, ou produção de ATP, sendo utilizado em uma série de reações aeróbicas (BAXTER; HARDINGHAM, 2016; WANG; MICHAELIS, 2010). Isso também pode ser prejudicial para as células quando não completamente reduzido, visto que a redução parcial desse oxigênio molecular é uma ocorrência comum no processo de fosforilação oxidativa, resultando em espécies altamente reativas, bem como oxigênio singleto, ânion superóxido,

peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e radical peroxila (WANG; MICHAELIS, 2010).

As espécies reativas de nitrogênio, incluindo o óxido nítrico (NO), o dióxido de nitrogênio, o trióxido de dinitrogênio e o peroxinitrito são tão prejudiciais quanto as EROS se não detoxificados da forma certa (BAXTER; HARDINGHAM, 2016). O NO, por exemplo, é um produto da reação catalisada pelo óxido nítrico sintase (NOS) e é relativamente pouco reativo, com exceção da reação de nitrosilação que ocorre entre ele e proteínas que contém sulfidril. Mesmo que seja pouco reativo, uma reação do óxido nítrico com o superóxido pode resultar em uma molécula altamente reativa, como o peroxinitrito, que pode nitrar proteínas em resíduos de tirosina, alterando a estrutura e função proteica. A esse processo, damos o nome de estresse nitrosativo (WANG; MICHAELIS, 2010). Além disso, o dano muscular pode liberar miocinas, como IL-6 ou IL-8, que também são responsáveis por induzir a produção de EROS (MRAKIC-SPOSTA et al., 2015).

2.2.2 Danos sistêmicos causados pelo exercício extenuante

A literatura tem poucos dados a respeito de efeitos sistêmicos do treinamento de ultra exaustão. A maioria dos estudos se concentram no sistema musculoesquelético pois mais da metade dos atletas em ultramaratonas apresentam algum problema muscular-esquelético (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018a).

Os danos musculo-esqueléticos mais frequentes incluem a inflamação do tendão de Aquiles e a síndrome femoro-patelar, porém, atletas iniciantes são mais susceptíveis ao dano do que atletas experientes e treinados, confirmando o potencial adaptativo induzido pelo treinamento do exercício físico (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b).

Alguns dos danos identificados durante uma ultramaratona são envolvidos com a desidratação, o que pode causar um processo de hiponatremia e, pela alta ingestão de fluidos, também pode resultar na diluição de outros compostos no soro (Borsato & Spinelli, 2017; Knechtle & Nikolaidis, 2018). Além disso, há uma influência direta dos metabólicos gerados pelo metabolismo ósseo que aumentam a reabsorção e reduz a formação óssea, levando a uma redução na densidade óssea (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b).

Durante a ultramaratona, há um aumento de biomarcadores como creatina quinase, creatina quinase-MB, troponina cardíaca 1 e proteína Creativa também, que são indicadores de dano cardíaco. Porém, esses valores podem variar de acordo com a velocidade e a distância da corrida (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b). A creatina quinase também é um biomarcador de lesão muscular. Essas mudanças geralmente são reversíveis (FREUND ET AL., 2014; KNECHTLE & NIKOLAIDIS, 2018B; PARUK ET AL., 2020). Variações estruturais e anatômicas no coração de atletas ultramaratonistas pós corridas também são importantes. Por exemplo, o tamanho do ventrículo esquerdo aumentado, anatomicamente, é uma variável que pode ser positiva para a performance da ultramaratona devido a adaptação na oxigenação sanguínea (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b).

O dano renal é causado pelo inicial dano muscular que pode gerar um influxo de proteínas musculares como mioglobina na corrente sanguínea. Em casos de desidratação, como no calor extremo em corridas localizadas em temperaturas elevadas, os rins acumulam essas proteínas musculares excessivas, o que resulta em níveis de creatinina, ureia, ácido úrico, sódio, potássio e cálcio aumentados. Porém, essa redução na função renal geralmente é temporária e reversível (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b).

Os danos digestivos são frequentes nos ultramaratonistas, sendo o mais presente a náusea, que pode ser explicado na variação da motilidade do esôfago durante a corrida. Além disso, não é rara a ocorrência de infecções como a endotoxemia, caracterizada pela liberação de LPS e altas 23 quantidades de endotoxinas pró-inflamatórias na corrente sanguínea pela presença de bactérias gram-negativas no sistema entérico que, resultam no perfil inflamatório agudo encontrado (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b).

2.2.3 Exercício exaustivo na modulação do perfil inflamatório

Mudanças na resposta inflamatória aguda pós ultramaratona vem sendo descritas, como um aumento na proteína C-reativa, aumento da ferritina, TNF-alfa, IFN- γ , IL1B, tudo isso acompanhado de uma leucocitose. Esses achados estão geralmente associados com o dano no sistema musculoesquelético e com biomarcadores encontrados no soro (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b; SKINNER et al., 2021).

Sabemos que o exercício físico, de forma geral, está envolvido com a liberação de miocinas pelo músculo na corrente sanguínea. A IL-6 é a primeira miocina encontrada no plasma depois de um exercício aeróbico extenuante (PEDERSEN et al. 2001). Alguns estudos tratam a IL-6 como um sensor energético, pois seus níveis são exacerbados quando o glicogênio intramuscular é comprometido (ALVES et al., 2022; SKINNER et al., 2021). Mesmo assim, não foi encontrada uma correlação da liberação de IL-6 com marcadores de dano muscular como a creatina quinase (CK). O envolvimento da IL-6 também pode estar associado com a modulação da lipólise e do metabolismo glicolítico tão utilizado durante um exercício extenuante - além disso, a disponibilidade de carboidratos aparenta regular os níveis de IL-6 durante o exercício (SKINNER et al., 2021).

Num estudo que avaliou o perfil inflamatório a partir de citocinas, vemos que houve um aumento de IL-6 proporcional à duração do exercício (PEDERSEN et al. 2001) e outros estudos confirmam esse resultado (ALVES et al., 2022; SKINNER et al., 2021). O aumento característico de IL-6 durante o exercício extenuante da ultramaratona pode estar ligado ao aumento da lipólise, como uma compensação sistêmica, para manter as necessidades energéticas cerebrais do indivíduo durante a ultramaratona quando comparado à maratona (MILLET; MARTIN; TEMESI, 2018; SKINNER et al., 2021; CAMILETTI-MOIRÓN, et al. 2013).

Outra miocina liberada durante o exercício físico é a IL-8, uma citocina pró-inflamatória clássica que atua como fator quimioatrativo para os leucócitos. O aumento dos níveis de IL-8, quando ligado ao dano muscular induzido por atividade física, está associado com o receptor CXCR-2, expresso nas células endoteliais microvasculares presentes no músculo, regulando a angiogênese muscular para facilitar a regeneração muscular (ALVES et al., 2022). Geralmente, IL-1 β e TNF- α são as citocinas mais expressivas em reações de fase aguda. A IL-1 β é a principal citocina envolvida com processos de inflamação, além de mediar processos celulares como proliferação, diferenciação e apoptose (ALVES et al., 2022).

O primeiro sinal de reconhecimento de dano se dá através dos receptores presentes na membrana celular. Ao identificar padrões de reconhecimento de dano (DAMPs) ou padrões de reconhecimento de patógenos (PAMPs), os receptores do tipo toll (TLR receptores) induzem uma ativação do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo. A partir disso, temos a oligomerização do inflamassoma NLRP3 (Skinner et al., 2021) que resulta na ativação da caspase-1. A caspase-1 é responsável pela

maturação da pró-IL1-B já produzida a partir de mecanismos de transcrição no núcleo e, a partir de uma clivagem, a molécula de IL1-B está ativa e pronta para intermediar reações inflamatórias (Figura 2).

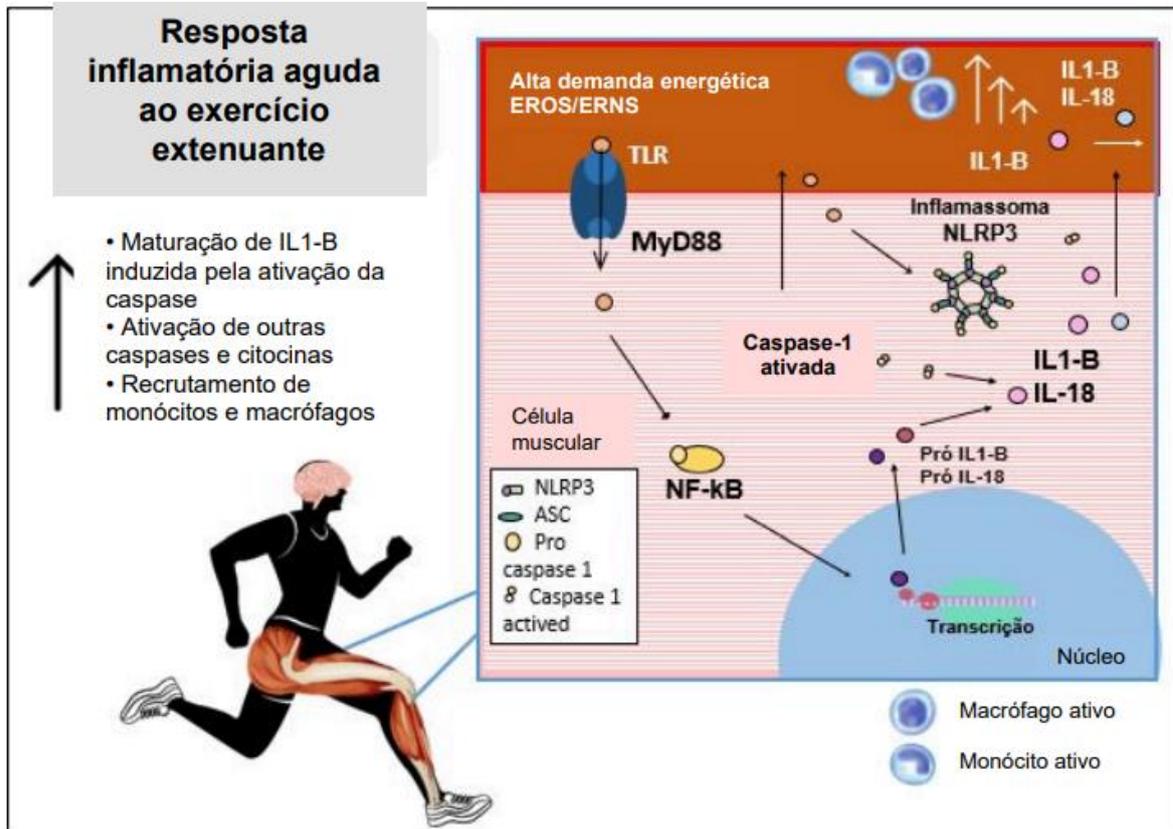


Figura 2: Resposta inflamatória aguda ao exercício extenuante. O receptor TLR reconhece os DAMPs e PAMPS associados a mudança de microambiente na corrente sanguínea, trazendo-o para dentro da célula. O NF-κB é ativado para iniciar a transcrição da pró-IL1-B e pró IL-18 dentro do núcleo. O inflamassoma em contato com as ERNS/EROS que conseguem ultrapassar a membrana, inicia um processo que resulta na ativação e liberação da caspase-1. A caspase-1 cliva a pró-IL-1B e a pró-IL-18, maturando e liberando-as na corrente sanguínea. O aumento da IL1-B na corrente sanguínea estimula o recrutamento de células do sistema imune e de outras citocinas (GONÇALVES, L. V. P. G., 2024).

Estudos variam quanto aos níveis de liberação destas citocinas depois de uma corrida de ultramaratona (ALVES et al., 2022). Além disso, Prócaspase-1 Caspase1 ativada Resposta inflamatória aguda induzida pelo exercício extenuante • Maturação de IL1-B induzida pela ativação da caspase • Ativação de outras caspases e citocinas • Recrutamento de monócitos e macrófagos Macrófago ativo

Monócito ativo Alta demanda energética EROS/ERNS Núcleo Caspase-1 ativada
Célula muscular Resposta extenuante ao exercício inflamatória aguda 25 vemos que a IL-6 demonstra alguns efeitos anti-inflamatórios, como na inibição de produção de TNF-alfa (um marcador pró-inflamatório). Os elevados níveis de IL-6 liberado pelo músculo também podem suprimir a produção de TNF-alfa, exercendo efeito anti-inflamatório (STARKIE et al., 2003). Logo, a função do processo inflamatório desencadeado com a ativação inicial da IL1-B tem base na resposta aguda à injúria, a fim de conter o dano (SKINNER et al., 2021).

Em um estudo comparativo realizado com atletas entre uma maratona tradicional e uma ultramaratona, foram observados níveis elevados de IL1-B, IL-6, IL-8, MCP-1 e IFN- γ em relação aos maratonistas tradicionais - a hipótese levantada é a de que o elevado aumento de IL1B pode ser o estopim para o aumento de outras citocinas (como IL-6, IL-8 e MCP-1) pela ativação da via do inflamassoma NLRP3 (SKINNER ET AL., 2021). A ativação de macrófagos do tipo M1 é o primeiro estímulo de resposta aguda do exercício de elevado volume, que estimula a produção de IL1-B a partir dessa estimulação direta ou indireta também (ALVES et al., 2022).

Um dos maiores moduladores encontrados nesse processo inflamatório, relacionado ao exercício físico, é o aumento da hemoglobina oxidada, um produto de hemólise identificado como um gatilho para ativação do NLRP3 e produção de IL-1B (ALVES et al., 2022; MILLET; MARTIN; TEMESI, 2018; SKINNER et al., 2021). Altos níveis de hemoglobina oxidada estimulam uma reação inflamatória crônica que pode criar um microambiente tóxico para a sobrevivência celular (ALVES et al., 2022). Nesse mesmo estudo, houve o aumento de outras citocinas próinflamatórias como IL-8 e MCP-1 e seus papéis também estão estritamente relacionados com o recrutamento de células inflamatórias, como monócitos, neutrófilos e linfócitos para o local de inflamação que seria o músculo (ALVES et al., 2022), na tentativa de conter a inflamação aguda. Esses resultados exibem uma resposta de fase aguda que pode estar envolvida com alguns danos encontrados de forma sistêmica relativos à ultramaratona (ALVES et al., 2022).

Uma correlação favorável foi relatada quando o treinamento prévio de elevado volume aumenta os níveis das células NK (natural killer), que tem uma influência positiva no sistema imune, reconhecendo células estranhas ao organismo, participando assim do mecanismo de vigilância imunológica. Ao mesmo tempo que a

ultramaratona reduz os níveis de imunoglobulina, o treinamento de exercício de elevada duração com moderada intensidade pode aumentar a concentração de imunoglobulinas e reduz o risco de infecção (KNECHTLE; NIKOLAIDIS, 2018b). Ou seja, o treinamento para as ultramaratonas pode ser benéfico para o indivíduo, mesmo que a corrida, per si, não tenha efeitos benéficos de forma imediata.

Se o exercício físico obtiver um limiar de recuperação, tempo e duração favoráveis, a maioria das alterações encontradas em marcadores de dano cardíaco, renais e imunes são reversíveis, bem como os danos estruturais (VAGNER et al., 2006; ALVES et al., 2022). Em atletas, esse limiar pode ser mais flexibilizado devido a uma maior resistência adquirida pelo treinamento físico. As quebras que ocorrem no estado redox, são uma indicação patofisiológica de doenças, principalmente no cérebro, no caso de doenças neurodegenerativas. Em um indivíduo treinado sem orientação, as chances da persistência de um dano crônico associado a ultra-exaustão podem exercer padrões negativos para a saúde do indivíduo em longo prazo (CURRIE et al., 2015).

2.3 RESPOSTA ANTIOXIDANTE CEREBRAL AO DANO OXIDATIVO

Dentre todos os sistemas que sofrem danos a partir do estresse oxidativo, o cérebro é um dos mais prejudicados. Essa maior vulnerabilidade cerebral é alimentada por várias características do sistema nervoso central, como: 1) a alta quantidade de oxigênio que as circuitarias neuronais demandam, 2) a abundância de metais redox-ativos (ferro e cobre podem catalisar uma produção mais tóxica de radicais livres, 3) o cérebro se constitui de lipídios e níveis altos de ácidos graxos poli-insaturados também oxidáveis que são extremamente importantes para as funções neuronais, mas torna o cérebro sensível ao ataque de EROS, 4) a perda de suporte trófico pode induzir a ativação do NOX e, além disso, 4) a resposta imune que resulta na ativação microglial induzida pela elevação de citocinas faz com que, além do alto nível de EROS, haja a expressão da sintase induzível do óxido nítrico (iNOS), que produz NO e citocinas inflamatórias (REN et al., 2017; WANG; MICHAELIS, 2010).

Os níveis de EROS/ERNS estão associados com mecanismos de neurodegeneração resultante de situações de estresse, como hipóxia ou hipoglicemia (WANG; MICHAELIS, 2010). Onde já há uma superprodução de

EROS/ERNS e uma baixa detoxificação dessa reatividade, como no envelhecimento ou algumas doenças, o estresse oxidativo influencia negativamente lipídios, proteínas e ácidos nucleicos devido a oxidação destas macromoléculas. (BAXTER; HARDINGHAM, 2016; HUBER; ALMEIDA, 2008). Algumas formas que o neurônio usa para se proteger desse processo danoso inclui renovação lipídica, degradação de proteínas e excisão e reparo de bases de DNA para impedir que as proteínas percam sua funcionalidade (WANG; MICHAELIS, 2010).

O sistema de neutralização responsável por atenuar o estresse oxidativo é o sistema antioxidante enzimático ou não-enzimático. No cérebro especificamente, o sistema antioxidante resume-se a 1) sistema da glutathione, 2) sistema tioredoxina/peroxiredoxina, e 3) o sistema superóxido dismutases e catalase (BAXTER; HARDINGHAM, 2016; HUBER; ALMEIDA, 2008; WANG; MICHAELIS, 2010).

Esse sistema antioxidante está sendo constantemente regulado pela célula astrocitária. Os astrócitos podem tanto produzir, armazenar e secretar agentes antioxidantes, tanto quanto remover aminoácidos excitatórios associados ao metabolismo do glutamato (BAXTER; HARDINGHAM, 2016). Sendo responsável pela comunicação entre a barreira hematoencefálica (BHE) e a célula neural, a célula astrocitária consegue detectar os desbalanços oxidativos e secretar ou não moléculas antioxidantes para balancear os níveis de radicais livres, variando seu fenótipo morfológico e bioquímico (BAXTER; HARDINGHAM, 2016; WANG; MICHAELIS, 2010).

Os astrócitos são necessários durante a fase aguda de resposta ao dano e também são responsáveis por secretar fatores neuroprotetores com a função de estimular uma regeneração do tecido lesado. Entende-se hoje que, além de suporte, o astrócito pode reagir ao dano de forma similar em alguns aspectos com a resposta da micróglia (JHA et al., 2019).

Em processo de dano neural, o astrócito, anteriormente em estado de repouso, muda o seu fenótipo para um estado reativo e hipertrófico. O nome desse processo é o de astrogliose reativa, caracterizado por uma morfologia alterada, e por variações na expressão gênica e proteica de acordo com o fenótipo adquirido (SOFRONIEW, 2020). Esse fenótipo depende do dano e do tipo de lesão. Podem exibir um fenótipo neuroprotetor, responsável pelo aumento na transcrição de moléculas que são favoráveis para a injúria, liberando fatores neurotróficos e

citocinas anti-inflamatórias, como LIF, IL6 e trombospondinas - estudos nomeiam esse astrócito de A2. A lesão também pode induzir um fenótipo neurotóxico. Esse fenótipo indica a expressão da cascata de complemento clássica relacionada com a poda sináptica, impedindo o crescimento de neuritos ou a formação de sinapses (JURGA et al., 2021). A esse astrócito, nomeamos de A1. Além disso, quando há um dano crônico e contínuo, o astrócito, que já secreta fatores pro-inflamatórios no fenótipo A1, pode amplificar a atividade inflamatória da micróglia e responder como um “crosstalk” negativo, tornando as células gliais cada vez mais ativas em “looping”. Logo, as células cerebrais deixam de exibir seu fenótipo protetor para tornarem-se as responsáveis pela fisiopatologia no dano (SOFRONIEW, 2020).

A γ -l-glutamil-l-cisteinil-glicina (glutathiona, GSH) é produzida em baixas concentrações por neurônios e em altas quantidades por astrócitos. A sua biossíntese envolve a participação de duas enzimas: γ -glutamil sintetase que será responsável pela formação da ligação peptídica entre os aminoácidos glutamato e a cisteína; e a glutathiona sintetase que liga esse 28 dipeptídeo à glicina, formando a glutathiona (BALDELLI et al., 2019; BAXTER; HARDINGHAM, 2016).

A via da glutathiona possui três grupos de enzimas responsáveis por catalisar reações de defesa do organismo: a glutathiona oxidase (GO), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a glutathiona redutase (GR) (HUBER; ALMEIDA, 2008). A glutathiona oxidase catalisa a reação que converte glutathiona (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG), especificamente, 2 moléculas de glutathiona dissulfeto e uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O GSSG, na forma "oxidada", é fundamental nas vias de sinalização redox devido ao seu efeito eliminador abrangente contra diversas espécies reativas de oxigênio. Exemplos de espécies reativas que podem ser eliminadas são o radical hidroxila (OH), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical lipídico peroxil (HOO), podendo acontecer de forma direta ou indireta, quando a redução ocorre através das enzimas antioxidantes já citadas. Todo esse processo é ilustrado na Figura 3. A razão entre GSH/GSSG é universalmente aceita como um indicativo do status redox celular devido a capacidade antioxidante do GSH (BALDELLI et al., 2019; BAXTER; HARDINGHAM, 2016; HUBER; ALMEIDA, 2008).

Já a glutathiona peroxidase, também localizada intracelularmente, tem diferenças estruturais das outras enzimas devido a adição de uma selenocisteína no seu sítio ativo (BALDELLI et al., 2019; HUBER; ALMEIDA, 2008). Sua atividade

antioxidante (cGPx clássica) é documentada por converter a molécula oxidativa H_2O_2 em $2H_2O$, oxidando o GSH em GSSG, além de ter ação reguladora em hidroperóxidos fosfolipídicos, liberados quando o ataque ocorre à membrana celular (PHGPx) (BALDELLI et al., 2019). A degradação do GSH ocorre de forma extracelular e esse processo é catalisado pela enzima γ -glutamyltranspeptidase (γ -GT), que cliva o GSH em cisteinil-glicina (Cys-Gly) e glutamato (BALDELLI et al., 2019; BAXTER; HARDINGHAM, 2016).

Quanto ao processo de síntese de novo de GSH, temos a glutathione reductase como responsável por ser a principal catalisadora desse ciclo de redução. A glutathione reductase auxilia na regeneração de GSH por intermédio da oxidação de NADPH, reduzindo o GSSG à GSH (BALDELLI et al., 2019). Nesse processo, um grupo sulfidril presente numa cisteína do sítio ativo da enzima ataca uma ligação sulfidrilica, liberando uma molécula de GSH. Depois disso, um ataque de forma intramolecular do grupo sulfidril do segundo resíduo de cisteína libera a segunda molécula de GSH, formando um dissulfeto cíclico. A partir daí a conversão de NADPH para NAD^+ possibilita a conversão desse dissulfeto ao GR e então, reinicia-se o ciclo redutivo (BALDELLI et al., 2019; BAXTER; HARDINGHAM, 2016).

O sistema da tioredoxina está intrinsecamente ligado com a via da glutathione, ajudando na manipulação do sistema de sinalização redox. Composto por TrxR, Trx e NADPH, ele também é um sistema redutor dissulfeto, como a via da GSH (REN et al., 2017). Um dos motivos que torna esse sistema imprescindível para o organismo, é que a atividade de TrxR no cérebro continua constante mesmo na deficiência grave de selênio (Se) - a GPx, por exemplo, perde maior parte de sua atividade (REN et al., 2017).

A tioredoxina reduzida faz parte de redutases eficientes com amplo espectro de substratos oxidativos, catalisando a conversão de ligações dissulfeto em tióis através de um mecanismo de troca dissulfeto-ditiol (REN et al., 2017). Tanto o GSH como o Trx oxidado são convertidos em tióis pelo consumo de NADPH através de ciclagem redox via TrxRs/GRs (REN et al., 2017). Um estudo relatou que a tioredoxina-1 protege astrócitos contra o estresse oxidativo pela manutenção da atividade da peroxidase (WANG et al., 2016).

O radical O_2^- é um dos EROS que mais provocam dano nas células e moléculas do organismo. Existe uma enzima responsável pela sua degradação com o nome de superóxido dismutase (SOD), que age quebrando os íons superóxido e

formando peróxido de hidrogênio (H₂O₂), (WANG; MICHAELIS, 2010). A enzima antioxidante catalase (CAT) por sua vez é responsável pela degradação do H₂O₂, resultando em um H₂O e O₂ (Figura 3) (BALDELLI et al., 2019; BAXTER; HARDINGHAM, 2016).

Alguns estudos elucidam a importância do sistema Trx mitocondrial na neutralização das EROS no cérebro e isso se deve a reduzida expressão da CAT (REN et al., 2017). A pouca expressão de CAT pode contrabalancear com a maior expressão de outras enzimas. Já que o Prx, GPx e CAT são responsáveis pela decomposição de H₂O₂ de forma específica e eficiente, vemos a importância do sistema glutathiona/tireodoxina no balanceamento do ambiente redox (BAXTER; HARDINGHAM, 2016; REN et al., 2017).

O NO é uma molécula que, apesar de ser um radical livre, também é envolvida com vários mecanismos homeostáticos atuando como sinalizadora molecular, como na regulação do tônus vascular ou na contração e relaxamento muscular (REN et al., 2017). NO é um radical livre sintetizado pela NO sintase endogenamente a partir da reação entre Larginina, NADPH e oxigênio, com o NADPH como doador de elétrons (BALDELLI et al., 2019; REN et al., 2017). Por estar envolvido com diversos processos, o NO possui uma grande versatilidade, apresentando-se em diversas formas redox com distintos processos de reatividade. Alguns mecanismos fazem com que o NO ligue-se ao GSH formando S- 30 nitrosoglutationa (GSNO) considerado uma reserva intracelular para conter o estresse nitrosativo (BALDELLI et al., 2019) (Figura 3).

O NO pode exercer efeitos diretos e indiretos: os diretos, acontecendo até em concentrações baixas, provém de sua interação com alvos biológicos; já os indiretos, em concentrações mais altas, são mediados pela interação do NO com espécies reativas (CALABRESE et al., 2007). Um exemplo onde NO pode atuar como "antioxidante" no estresse oxidativo/nitrosativo é quando liberado por macrófagos ativados. Estes, inibem as enzimas produtoras de EROS, as NADPH oxidases, o que possivelmente ocorre via nitrosilação de proteínas seguida pela perda do grupo protético heme, onde fica o oxigênio (BALDELLI et al., 2019). O crosstalk entre NO e GSH é o pivô da manutenção da homeostase no músculo, visto que o músculo retoma o GSH do plasma em altos níveis de espécies reativas, e elevados índices de NO, formando ONOO⁻ ou NO₂, correlacionando-se com dano irreversível para proteínas (Figura 3) (BALDELLI et al., 2019).

Além da NOS neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS), existe a NOS induzida (iNOS) que é regulada de forma independente de cálcio ou calmodulina e não é expressa de forma constitutiva. A expressão de iNOS e produção de NO pode ser induzida por citocinas inflamatórias e LPS liberados pelas bactérias (REN et al., 2017). O NO também pode se envolver numa modificação pós-transducional (PTM) também chamada de S-nitrosilação, que adiciona de forma direta a molécula de NO a um tiol reativo de cisteína, formando S-nitrosotióis (SNOs), podendo alterar o estado homeostático e a atividade proteica (REN et al., 2017).

No SNC, o NO funciona como neurotransmissor excitatório através da ativação endógena da guanilato ciclase solúvel, resultando na formação de GMP cíclico (cGMP) e ativação constante dos receptores de NMDA. Além disso, o NO também pode fazer S-nitrosilação. Esse PTM no SNC pode determinar ou não a viabilidade das células neuronais (REN et al., 2017). De forma positiva, a S-nitrosilação pode proteger os neurônios da excitotoxicidade induzida pelo glutamato (CALABRESE et al., 2007; BAXTER; HARDINGHAM, 2016; REN et al., 2017). O NO produzido pela nNOS pode realizar a nitrosilação de tióis específicos nas subunidades do receptor NMDA e modular negativamente o influxo de íons. E isso pode ocorrer em várias moléculas, como fatores de transcrição, sítio ativo cisteína de caspases, desempenhando um possível papel protetor (REN et al., 2017). Negativamente, essa nitrosilação de proteínas está associada a alterações patológicas tendo o estresse nitrosativo como causa. Se temos a S-nitrosilação de enzimas antioxidantes, temos prejuízo no mecanismo oxiredutivo. A S-nitrosilação de diferentes moléculas pode contribuir para o acúmulo de proteínas mal dobradas, bem como processos de autofagia e apoptóticos (KNOT et al., 2009; REN et al., 2017).

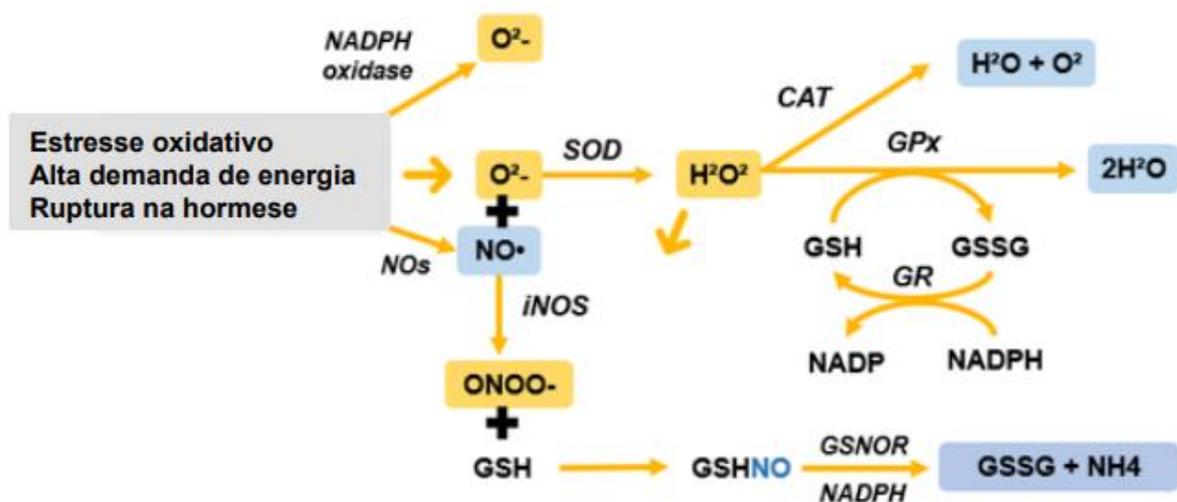


Figura 3: Resposta de enzimas antioxidantes importantes para a manutenção da homeostases para conter danos oxidativos e nitrosativos (GONÇALVES, L. V. P. G., 2024).

2.4 ALTERAÇÕES NO SNC INDUZIDAS PELO EXERCÍCIO FÍSICO E NEUROPLASTICIDADE.

Diferentes estímulos induzem respostas diferentes no cérebro, e essa variação, no que se refere ao exercício, pode ser relativa à intensidade, volume ou tipo de exercício praticado. Por exemplo, o exercício aeróbico e de resistência modula a memória espacial de duas formas diferentes: no aeróbico, isso ocorre pela modulação do BDNF hipocampal, já o exercício de resistência, possui efeitos mais proeminentes relativos ao IGF-1 central (HORTOBÁGYI et al., 2022).

Estudos realizados tanto em animais como humanos elucidam que a chave para a compreensão dos efeitos do exercício físico está na intensidade (CURRIE et al., 2015; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ et al., 2022). Sabemos que um exercício aeróbico em intensidade crescente potencializa gradativamente as respostas cardiometabólicas produzidas por exercícios de menor intensidade. O treinamento de resistência de alta intensidade também aumenta as funções contráteis e neuromusculares produzidas pelo treinamento de moderada intensidade (HORTOBÁGYI et al., 2022).

O treinamento aeróbico melhora a capacidade antioxidante, a afinidade das mitocôndrias pelo oxigênio, eleva níveis de proteínas envolvidas com a fosforilação oxidativa, além de afetar positivamente a biogênese mitocondrial. As mudanças anteriormente descritas podem ser neutralizadas de forma dependente da intensidade, resultando na por uma produção elevada de EROS, o que é prejudicial à neuroplasticidade e ao funcionamento cognitivo (HORTOBÁGYI et al., 2022).

Alguns limitam o estudo da neuroplasticidade a processos relacionados com o aprendizado e o desenvolvimento de novos hábitos apenas, mas o cérebro utiliza desse atributo tanto em situações danosas como resultado de privação sensorial (HORTOBÁGYI et al., 2022; HÖTTING; RÖDER, 2013). A neuroplasticidade é a capacidade do sistema nervoso de modificar sua organização interna e circuitaria a partir de demandas do ambiente. As reorganizações encaminhadas ocorrem primariamente através da ativação de respostas neuroquímicas que resultam em

mudanças corticais estruturais, alterando o comportamento fenotípico do indivíduo (HÖTTING; RÖDER, 2013).

A neuroplasticidade pode induzir também mudanças mal adaptativas, resultando em consequências comportamentais negativas. O desenvolvimento e manutenção do comportamento de adição ou “vício” em drogas psicoativas, por exemplo, pode ser associado com a reorganização em regiões frontais e hipocampais relativas ao consumo frequente da substância (HORTOBÁGYI et al., 2022; HÖTTING; RÖDER, 2013). Essas modulações mal adaptativas podem ocorrer diante de outros estímulos tóxicos (HORTOBÁGYI et al., 2022).

Estudos que buscam estímulos indutores de neuroplasticidade são importantes para buscar a possibilidade de tratar doenças neurodegenerativas ou danos neuronais. Essa busca inclui mecanismos e áreas que estejam associadas com o processo de aprendizado e a memória, que é tão prejudicado após o declínio cognitivo do envelhecimento (HORTOBÁGYI et al., 2022). Uma dessas terapêuticas indicadas por especialistas para induzir a neuroplasticidade é o exercício físico (de Souza Fernandes, et al. 2020).

Ao nível molecular, o lactato liberado pelo músculo no treinamento anaeróbico estimula a proliferação de neurônios e células gliais, além da produção de BDNF (BAXTER; HARDINGHAM, 2016; FERNÁNDEZRODRÍGUEZ et al., 2022; HORTOBÁGYI et al., 2022). Isso tem um grande papel na neuroplasticidade pelo estímulo à neurogênese. Esse lactato também pode aumentar a excitabilidade neuronal, além de favorecer a liberação de fatores de crescimento endotelial vascular, estimulando a angiogênese cortical, realizar a captação de cetonas e a iniciar a depuração de beta-amiloide e outros produtos residuais prejudiciais aos neurônios (HORTOBÁGYI et al., 2022; HÖTTING; RÖDER, 2013).

O exercício pode estimular mecanismos que envolvem o fator de crescimento de insulina (IGF-1) e atuar por diversas vias (HÖTTING; RÖDER, 2013). O exercício praticado de maneira regular também modula a biogênese mitocondrial, melhorando a capacidade antioxidante, a afinidade das mitocôndrias pelo oxigênio e as proteínas envolvidas na geração de ATP. Além disso, o exercício estimula a formação de sinapses e a reestruturação das anteriores (LI et al., 2021).

O astrócito está intimamente envolvido com processos sinaptogênicos, além da modulação ativa do processo neuroplástico. Os finos processos astrocíticos envolvem terminais pré-sinápticos e dendritos de sinapses excitatória, fornecendo

base estrutural para a comunicação sináptica (DZYUBENKO; HERMANN, 2023). Além de regular a 33 sinaptogênese, o astrócito libera moléculas de adesão que promovem formação e estabilização de sinapses, favorecendo a manutenção da transmissão sináptica. A trombospondina (TSP-1 e TSP-2) é um exemplo de glicoproteína liberada pelo astrócito que está intimamente associada com o desenvolvimento de novas sinapses em diversas condições incluindo as induzidas pelo exercício físico de intensidade moderada (HOL; PEKNY, 2015).

Mesmo não possuindo potenciais de ação semelhantes aos neurônios, os astrócitos podem reagir a estímulos através de elevações transitórias de Ca^{2+} intracelular (DZYUBENKO; HERMANN, 2023). Essas elevações podem desencadear a liberação de várias moléculas para os neurônios, bem como gliotransmissores que podem regular a atividade sináptica e a excitabilidade neuronal. O lactato liberado pelo exercício (a partir da via metabólica anaeróbica), por exemplo, é transportado ao neurônio pela via astrócito-neurônio pois a glicólise (via metabólica aeróbica) é regulada negativamente no neurônio (DZYUBENKO; HERMANN, 2023; VIGHLARSEN et al., 2021). Logo, a principal fonte de energia para a manutenção da atividade neuronal está ligada a funcionalidade astrocitária (DZYUBENKO; HERMANN, 2023).

A micróglia também está envolvida na neuroplasticidade induzida pelo exercício físico por ser uma das maiores reguladoras de remodelagem sináptica (LI et al., 2022). A eliminação de sinapses específicas de forma dependente de atividade neuronal é garantida pelos componentes fagocíticos do complemento C1q e C3 na micróglia e pela exposição de fosfatidilserina e pentraxinas nas membranas pré-sinápticas (DZYUBENKO; HERMANN, 2023).

O treinamento aeróbico também auxilia no desenvolvimento de habilidades que resultam na melhora do funcionamento cognitivo (HÖTTING; RÖDER, 2013; LIANG et al., 2021). Pesquisas relatam a importância do exercício aeróbico em processos específicos, como em funções executivas e habilidades que requerem um maior controle cognitivo (Contreras-Osorio et al., 2022). Por habilidades executivas, temos atenção visual e auditiva ou controle motor, bem como o desenvolvimento de outras habilidades relacionadas à linguagem. Respostas como estas podem levar ao remodelamento da circuitaria do córtex cerebral, resultando em modificações estruturais (HÖTTING; RÖDER, 2013; LI et al., 2021).

Os mecanismos de gliotransmissão, mesmo que não sejam todos esclarecidos, favorecem a modulação da atividade neuronal em situações homeostáticas, de dano ou de estresse. Além disso, o cérebro demonstra uma capacidade de autorregulação estável de suas redes cerebrais, atuando como um sincício celular em busca da estabilização homeostática (DZYUBENKO; HERMANN, 2023).

Essa questão torna-se mais abrangente quando adicionamos outros fatores, como o envelhecimento ou doenças neurodegenerativas. Estrela et al. (2017) buscou compreender a variação de volume cerebral em indivíduos atletas idosos para compreender os mecanismos funcionais deste tipo de exercício associado a um dano prévio. O estudo foi realizado com atletas idosos exercitando-se numa corrida de elevado volume em comparação a uma corrida de volume reduzido; mostrou-se que o exercício de elevado volume em idosos induz um perfil inflamatório e redox mais favorável do que o de baixo volume (ESTRELA et al., 2017).

A capacidade do cérebro de armazenar e modular informações é resultado da plasticidade sináptica, como por exemplo, no mecanismo envolvido na formação de memórias. Sabemos que à medida que novos neurônios e circuitarias se integram, eles podem substituir conexões anteriores (LOPRINZI, P. 2019; ABRAHAM & BEAR, 1996). Para a plena compreensão de como a informação é armazenada no cérebro, temos o processo de potenciação de longa duração (LTP) que é um mecanismo de aumento de repostas pós-sinápticas glutamatérgicas depois de estimulações síncronas e recorrentes que podem resultar na melhoria da transmissão do sinal a longo prazo. Isso significa que se torna mais fácil atingir aquele resultado devido a uma adaptação que facilita a transmissão sináptica (BECKHAUSER et al. 2016; ABRAHAM & BEAR, 1996). Por ser uma via basicamente glutamatérgica, o seu receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) é um receptor inotrópico glutamatérgico desempenha um papel importante nesse armazenamento. Quando se encontra perto do terminal pré-sináptico, o NMDA é responsável por permitir o influxo de cálcio nos neurônios pós-sinápticos (BALTACI, S. et al, 2019). Em conjunto com a Calmodulina, proteína ligante de Ca^{2+} , regulam a atividade de proteínas intracelulares. As proteínas reguladas pelo LTP são proteínas imprescindíveis na formação de memória de curto prazo a partir de um processo de facilitação sináptica. Essas proteínas vão tornar o neurônio pós sináptico mais susceptível a gerar novos potenciais de ação daquele mesmo estímulo (BALTACI, S. et al, 2019).

Assim que ocorre o influxo de cálcio, a expressão da plasticidade sináptica requer ativação de proteínas ligadas a cascatas de sinalização, como cálcio calmodulina quinase II (CaMKII), quinase regulada por sinal extracelular (ERK), proteína quinase A dependente de adenosina monofosfato cíclico (CAMP) (PKA) e proteína quinase C (PKC). Dependendo do sinal e da via ativada, estas podem modificar a quantidade e a eficácia de receptores AMPA de glutamato no receptor pós-sináptico. A depressão de longa duração (LTD) também é importante na consolidação de memórias pois permite também o esquecimento de informações que não são mais importantes, ou que não são mais estimuladas, para a permanência de informações relevantes (BALTAÇI, S. et al, 2019; ABRAHAM & BEAR, 1996). O LTD é caracterizado pela redução do fluxo de cálcio a partir desse estímulo. Com o nível de Ca^{2+} abaixo do limiar de ativação sináptica, temos o esquecimento da informação até que o estímulo seja alto de novo, iniciando um processo de reconsolidação. Quando o LTP é induzido, a quantidade de receptores AMPA aumenta e o oposto ocorre quando falamos no LTD (BALTAÇI, S. et al, 2019).

O NO atua como mensageiro retrógrado na liberação de mais glutamato na fenda sináptica. Um influxo de cálcio a longo prazo ativa vias que regulam o fator de transcrição CREB-2 que pode regular a síntese proteica de proteínas ligadas ao BDNF, por exemplo, que atua por meio da formação de novas sinapses. A esse processo, é chamado de plasticidade sináptica (ABRAHAM & BEAR, 1996). Evidências de vários estudos indicam que o exercício moderado melhora a LTP em várias regiões cerebrais. No hipocampo, por exemplo, este efeito persistiu mesmo após um período de sedentarismo (DONG et al., 2022). Por outro lado, evidências obtidas a partir de manipulações genéticas mostram a importância de níveis fisiológicos de EROS sobre a plasticidade sináptica. Assim, a redução na produção de EROS afeta negativamente o LTP no hipocampo sugerindo que a plasticidade hipocampal envolvida na formação de memórias e/ou na sua consolidação requer estados redox específicos (BECKHAUSER et al. 2016).

2.5 VULNERABILIDADE NEURONAL SELETIVA E EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO

A susceptibilidade específica de certas regiões do cérebro ao dano oxidativo é vista em algumas áreas cerebrais específicas como o hipocampo ou as células neuronais cerebelares, mesmo que seja um conceito pouco investigado. Cada área cerebral possui uma demanda específica de acordo com as necessidades dos circuitos neurais e do fenótipo neuroquímico daquela respectiva área (WANG; MICHAELIS, 2010).

Alguns dos fatores que a literatura traz em resposta a essa maior susceptibilidade de algumas áreas cerebrais são 1) um aumento de EROS intrínseco ao tipo de neurônio e a sua necessidade energética, 2) disfunção mitocondrial que resulta na baixa produção de ATP que não supre as necessidades celulares, 3) a demanda de sinalização diferente dos tipos de populações neuronais, e também 4) a proporção reduzida de astrócitos/ neurônios pode aumentar a vulnerabilidade dos neurônios a condições como o estresse oxidativo (WANG; MICHAELIS, 2010).

De forma maléfica ou benéfica, as respostas gliais podem variar de acordo com o nível de estresse no microambiente e de acordo com as moléculas imunes secretadas (ALVES et al., 2022; ESTRELA et al., 2017). Quando há uma instabilidade no sistema redox ou processos degenerativos no sistema nervoso central, os astrócitos e as células microgliais podem atuar na busca de reestabelecer a integridade regional (BAXTER; HARDINGHAM, 2016). A micróglia é a primeira célula imune presente na variação redox e é responsável pela liberação de citocinas pró- e antiinflamatórias para combater e limitar o processo inflamatório. Essas citocinas irão estimular a ativação da célula astrocitária que também liberará moléculas sinalizadoras e quimiotáticas, retroalimentando a ativação microglial e resultando em um “crosstalk” que prolonga a ativação de ambas as células, o que pode resultar em prejuízo crônico (JHA et al., 2019).

Alguns estudos indicam que a disfunção astrogliar pode ter influência na vulnerabilidade dos neurônios em regiões com o estado redox alterado (BAXTER; HARDINGHAM, 2016; WANG; MICHAELIS, 2010). Estes, incluem dados genômicos que evidenciam o aumento da ativação transcricional de genes relacionados a respostas inflamatórias em regiões de maior vulnerabilidade (WANG; MICHAELIS, 2010). Mesmo que, na maioria das vezes, respostas inflamatórias possam proteger o neurônio, há evidências de que a inflamação crônica pode ser a causa da vulnerabilidade seletiva neuronal.

Uma grande diferença na resposta de neurônios granulares cerebelares e neurônios corticais foi descrita (WANG; MICHAELIS, 2010). Quando o neurônio cerebelar foi colocado numa tensão de oxigênio de 20% in vitro, houve aumento de células mortas enquanto as culturas primárias de neurônios corticais sobreviveram (WANG et al., 2009). O mesmo ocorreu após indução ao estresse oxidativo por Paraquat (BHATIA et al., 2019). Além disso, as células cerebelares exibiram uma maior expressão de genes associados com o dano oxidativo (WANG et al., 2009). Discute-se que a vulnerabilidade dos neurônios cerebelares ao estresse oxidativo pode estar correlacionada com a coordenação motora reduzida e o prejuízo ao aprendizado motor associado com o envelhecimento (ISKUSNYKH et al., 2024).

Um estudo que investigou o cérebro de indivíduos treinados logo após uma corrida de ultramaratona, encontrou-se uma redução acentuada e regional-específica na substância cinzenta de áreas occipital-parietais e temporais, além do córtex cingulado anterior e o núcleo caudado direito ventral (FREUND et al., 2014). A discussão deste achado baseia-se no fato da redução da matéria cinzenta dessas áreas ter ou não ligação com frequente demanda de ativação cerebral durante a corrida, ou seja, uma redução da matéria cinzenta região-específica poderia estar associada à redução de ativação de áreas não-utilizadas durante a corrida. Porém, foram vistas reduções em áreas ligadas a processamento espaço-visual, associação auditivas e em planejamento motor, mesmo que essas alterações sejam 37 reversíveis após 80 dias, devido ao treinamento atlético prévio (FREUND et al., 2014). Neste mesmo estudo, foi visto uma redução de 11% da massa cinzenta global do indivíduo 24 horas após a realização de ultramaratona (FREUND et al., 2014).

Visto que o cérebro em envelhecimento reduz cerca de 1% ao ano, a questão torna-se a de entender se a reversibilidade estrutural e bioquímica após exercício de ultra exaustão ocorre devido a uma adaptabilidade do treinamento de elevado volume prévio realizado por atletas e se haveriam efeitos negativos irreversíveis ou danosos. Por outro lado, um outro estudo sugere que o treinamento de alto volume, ao longo da vida, produz altos níveis de aptidão cardiorrespiratória e relaciona-se fortemente com aumento na substância cinzenta do córtex cerebral, o que constrói uma reserva cortical no início da vida e mantém esse benefício ao longo da faixa etária de 40 a 70 anos (WOOD et al., 2016). Uma análise mais recente realizada com 14 atletas do sexo masculino, detectou aumento no volume de regiões corticais

e subcorticais como tálamo, caudado, globo pálido e hipocampo, após ultramaratona de 119.2 Km (SINGIN et al., 2021). Neste mesmo estudo, foi também detectado que o líquido cérebro espinhal bem como a substância branca não foi alterado.

A despeito da inexistência de um consenso entre os estudos que avaliaram a vulnerabilidade do sistema nervoso ao exercício de elevado volume, discute-se que a prática regular do exercício aeróbico é capaz de reduzir os danos relativos ao exercício extenuante agudo, resultando em um processo de adaptação aos desafios oxidativos (ESTRELA et al., 2017; FREUND et al., 2014; LIANG et al., 2021; PARUK et al., 2020).

2.6 GFAP NA MODULAÇÃO DA FUNCIONALIDADE ASTROCITÁRIA

Como visto anteriormente, o astrócito ativado difere do astrócito em repouso por ser um participante ativo de processos imunes no SNC. Em diversos tipos de condições patológicas, as células astrocitárias ativam-se, hipertrofiam, proliferam e elevam os níveis dos filamentos intermediários (FI) presentes no citoesqueleto astrocitário, caracterizando a astrogliose (HOL; PEKONY, 2015).

O citoesqueleto dos astrócitos modula-se a partir de processos dinâmicos de proliferação e despolimerização dos FI. Durante a astrogliose, a hipertrofia permite que o astrócito alcance toda a extensão da lesão, auxiliando no isolamento e facilitando a resolução (HOL; PEKONY, 2015). A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) é o principal filamento intermediário encontrado nos astrócitos do SNC, sendo biomarcador tanto da presença astrocitária como da astrogliose (BRENNER; MESSING, 2021; LIN et al., 2021). Os elevados níveis de GFAP indicam uma maior resposta proliferativa e hipertrófica do astrócito a processos danosos. Além do GFAP, outros IFs que fazem parte do citoesqueleto, como a vimentina e a 38 nestina, também podem sofrer alterações (DZYUBENKO; HERMANN, 2023).

A principal função da proteína GFAP é a de garantir a estabilização do citoesqueleto e ser a base dos processos que envolvem a comunicação célula-barreira hematoencefálica, permitindo a nutrição e o suporte neuronal (LI et al., 2020). O gene GFAP modula respostas transcricionais na proteína de filamento, mas alguns fatores de transcrição podem modular a expressão do GFAP, iniciando processos de diferenciação ou suprimindo a atividade gênica (BRENNER; MESSING, 2021). Os principais fatores de transcrição que regulam a expressão

gênica de GFAP incluem a cascata Janus kinase-2 (JAK2), o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), a sinalização do NF- κ B (NF-Kb), proteína quinase reguladora de sinalização extracelular (ERK) 1/2/c-Jun-N-terminal-quinase (JNK) e PPAR γ (LI et al., 2020).

A transcrição proteica também pode ser regulada epigeneticamente através de enzimas modificadoras de cromatina, que podem influenciar o estado fenotípico das moléculas de GFAP através de estados de fosforilação e metilação (BRENNER; MESSING, 2021; HOL; PEKONY, 2015; LI et al., 2020). Além disso, estudos demonstram que proteínas quinases (PKA e PKC) também são importantes para a modulação de GFAP de forma pós-translacional (LI et al., 2020).

Em algumas condições adversas, o influxo de Ca²⁺ e as junções comunicantes ativam JNK que fosforila c-Jun para facilitar a ligação do fator de transcrição gênica AP-1 ao promotor do gene GFAP, auxiliando na sua expressão. Essa mobilização de cálcio intracelular também ativa PKA e PKC causando hiperfosforilação do GFAP em astrócitos (LI et al., 2020). A ativação de JNK também pode ser modulada por proteínas quinases envolvidas com a via da MAPK, principalmente em situações relacionadas com estresses.

Quando há regulação positiva da via JAK2/STAT3, por exemplo, temos um padrão que é a ativação da glicoproteína 130 (GP130). A GP130 é um receptor comum da família de citocinas e algumas moléculas ligam-se e ativam esse receptor, como a IL-6, o fator inibitório de leucemia (LIF), entre outros (BRENNER; MESSING, 2021). Como já vimos, a IL-6 é uma miocina liberada pelo músculo durante o exercício físico, podendo ativar o receptor GP130 e resultar na fosforilação e ativação da via JAK2/STAT3, com consequente aumento na expressão de GFAP (ALVES et al., 2022). Essa via também está envolvida com a regulação positiva de outras citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1-B (IL1-B). O NF- κ B também pode ser considerado um fator de transcrição da expressão genica de GFAP. Estudos indicam que a iNOS e o receptor Toll-like 4 (TRL4) são elevados na ativação da via NF- κ B. O 39 iNOS, por exemplo, liga-se com o NF- κ B no citoplasma e promove a sua transferência para o núcleo (LI et al., 2020).

Há um efeito ambíguo do PPAR γ na regulação da expressão de GFAP, podendo inibir ou estimular o perfil transcricional. Isso pode ser explicado pela atividade de enzimas modificadoras de cromatina - essa molécula é dependente da

ativação de outras vias e moléculas (BRENNER; MESSING, 2021; LI et al., 2020). Ele pode ser regulado positivamente dependendo da ativação de outra cascata, a via fosfatidilinositol quinase 3 (PI3K)/AKT; já a regulação negativa depende da CDK5, o que é mais relacionado a ativação da via pERK1/2 e JNK (Figura 5) (LI et al., 2020).

A ERK1/2 é uma quinase mitogênica que secreta sinais facilitadores para a expressão de GFAP (BRENNER; MESSING, 2021; LI et al., 2020). Tanto ela como a JNK e a p38 estão envolvidas com a via de ativação da MAPK, envolvidas com diferenciação, proliferação e sobrevivência (Figura 5) (LI et al., 2020). Temos uma quinase dependente de ciclina (CDK5), juntamente com a p35, que está envolvida com a fosforilação de PPARYr - fator de transcrição inibitório do gene GFAP. Essa quinase irá estimular a fosforilação do PPARY para permitir que o PPARY iniba a expressão gênica de GFAP. Sem a fosforilação de PPARY, devido a baixos níveis de CDK5, a ERK1/2 e JNK estimulam a transcrição gênica da molécula (Figura 5). Além disso, a ativação de CDK5 pode contrabalancear a superexpressão de GFAP em casos de astrogliose (LI et al., 2020). A pERK1/2 também é responsável por induzir um aumento transiente na expressão de GFAP (LI et al., 2020), além de sua sinalização estar envolvida com a capacidade migratória de astrócitos reativos e a extensão da fibra de GFAP ao redor do núcleo (DZYUBENKO; HERMANN, 2023; LI et al., 2020). Em ratos com hipoperfusão cerebral crônica, que é responsável por aumentar os níveis proteicos da pERK1/2, o treinamento físico aeróbico de baixo volume (20 min) por 2 meses reduziu os níveis desta molécula bem como da p-JNK, o que configurou um mecanismo de neuroproteção (CAO et al., 2022).

A expressão de GFAP varia, principalmente, em processos neuro inflamatórios. Essas mudanças vão depender quase que totalmente do microambiente, visto que a plasticidade do GFAP está intimamente ligada a mudança nas funções neuronais (BRENNER; MESSING, 2021; LI et al., 2020). A anormalidade do GFAP e a plasticidade disfuncional do astrócito podem variar a excitabilidade dos neurônios próximos, a neurogênese e o sistema de reparo, bem como causar apoptose e degeneração tecidual (WANG; MICHAELIS, 2010).

Porém, cada tipo de neuroinflamação, cada qual com suas variações antigênicas, pode liberar diferentes citocinas e ativar diferentes vias que modulam diferencialmente a expressão de GFAP - de diferentes formas e em diferentes condições (ALVES et al., 2022; HOL; PEKONY, 2015; LIN et al., 2021).

Subtipos adversos de GFAP são vistos devido a variação nos sítios de fosforilação do gene GFAP. Esses, dependendo das vias sinalizatórias ou moléculas de ativação, podem produzir diferentes padrões de estabilidade das fibras de GFAP (HOL; PEKNY, 2015; LI et al., 2020).

O GFAP tem algumas isoformas em que a massa molecular varia entre 30 e 53kDa, além disso, variações nas isoformas de GFAP podem ser resultantes de processos danosos. Até 12 isoformas de GFAP já são reconhecidas na literatura (BRENNER; MESSING, 2021; LI et al., 2020; LIN et al., 2021). Essas isoformas podem resultar de locais de início alternativo bem como processos de splicing alternativo que ocorre no gene GFAP – no splicing alternativo, éxons são clivados em locais diferentes na molécula de RNA recém-sintetizada (também chamada de premRNA) e a transcrição dos éxons varia, gerando isoformas diferentes de um único gene (BRENNER; MESSING, 2021; HOL; PEKNY, 2015). No cérebro humano, temos a presença de outras isoformas como GFAP α , β , δ , ζ , κ , Δ 135, Δ 164, Δ exon6, e Δ exon 7; já no cérebro de roedores, também há a expressão do GFAP γ além dos citados, mas não há as isoformas Δ 135, Δ 164 e Δ exon6 como no cérebro humano (LI et al., 2020).

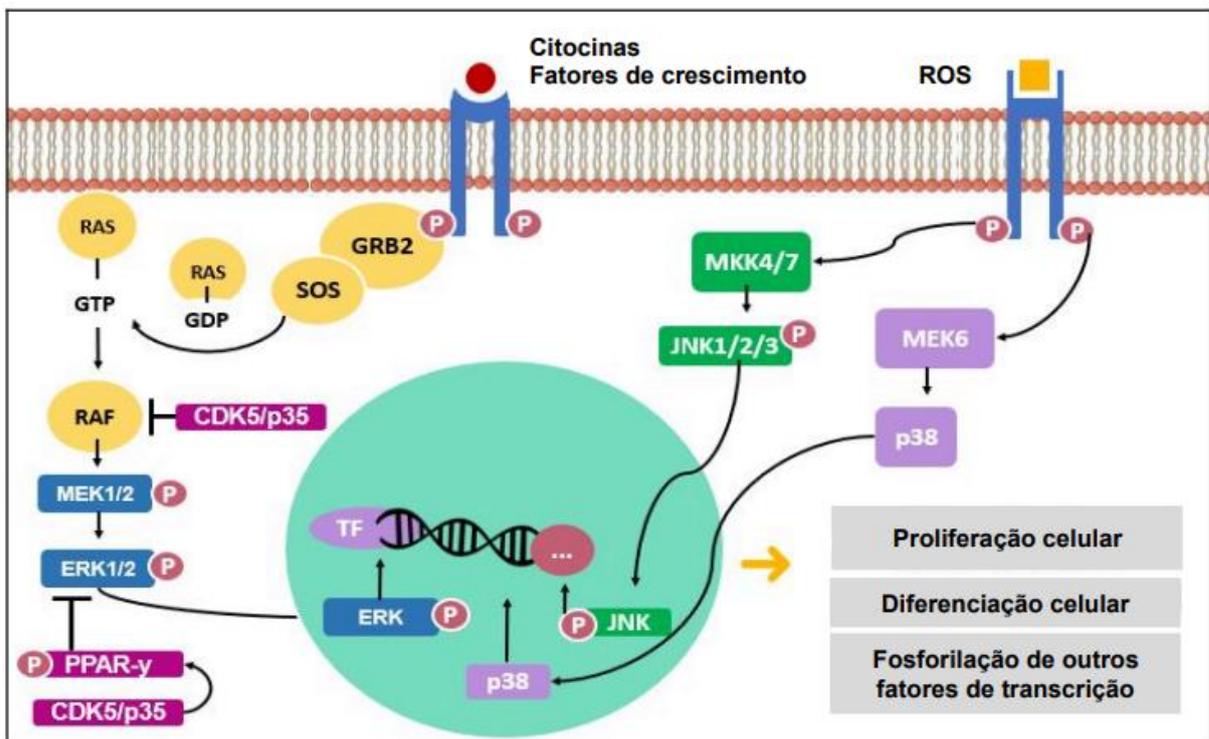


Figura 5: Vias e fatores de transcrição envolvidos com a modulação gênica da molécula GFAP a partir de proteínas quinases (GONÇALVES, L. V. P. G., 2024).

Dentre todas, a GFAP α é a mais abundante no astrócito, tendo um papel primordial na integridade morfológica do astrócito e na homeostase Citocinas Fatores de crescimento ROS Proliferação celular Diferenciação celular Fosforilação de outros fatores de transcrição 41 (BRENNER; MESSING, 2021; LI et al., 2020). A redução de GFAP em processos apoptóticos específicos pode ser correlacionada com a redução de GFAP α , especificamente, o que é compensado com um aumento das outras isoformas (HOL; PEKONY, 2015; LI et al., 2020). O GFAP δ , por exemplo, é expresso por células proliferativas da glia radial, sendo mais proeminente em fases de neurodesenvolvimento. Geralmente, pode estar localizado em nichos neurogênicos importantes durante a vida do indivíduo, como a zona subventricular (SVZ) (LI et al., 2020; LIN et al., 2021). Outra isoforma que também pode ser regulada positivamente durante o desenvolvimento do sistema nervoso é o GFAP- κ , uma isoforma presente no perfil fenotípico de glia entérica e, por vezes, pode estar em níveis elevados na doença de Parkinson (HOL; PEKONY, 2015; LIN et al., 2021).

Mesmo que os elevados níveis de GFAP α presentes na célula astrocitária contribuam para a estabilização da rede de FI, o aumento de GFAP δ pode levar ao colapso do citoesqueleto, com mudanças visíveis na morfologia celular, mesmo que não haja alteração na migração celular ou na proliferação (LI et al., 2020). Quando há uma superexpressão da molécula de GFAP, podemos ter um fenótipo fatal onde temos uma quantidade grande de agregados proteicos similares às fibras de Rosenthal (RFs) encontradas em pacientes humanos com diagnóstico de doença de Alexander (BRENNER; MESSING, 2021; LIN et al., 2021). O papel das isoformas de GFAP e das moléculas ligadas a modulações estruturais nos astrócitos ainda vem sendo elucidado por estudos. Estes buscam a compreensão funcional da célula astrocitária e a importância desta molécula tanto na homeostase como em processos danosos.

2.6.1 Exercício físico como modulador da expressão de GFAP

Como já dito, o potencial benéfico do exercício físico pode variar de acordo com intensidade, duração e outras variáveis relativas ao tipo de exercício físico. A astrogliose durante o exercício físico também pode revelar-se tanto de forma neuroprotetora como neurotóxica, de forma dependente do estímulo antigênico (LI et al., 2020). Ciente que a vulnerabilidade seletiva neuronal torna áreas cerebrais

específicas mais vulneráveis à danos, as diferenças astrocitária também estão associadas às variações funcionais relativas à área. Como já citado, a redução de volume encontrada no cérebro de ultramaratonistas é região específica, tendo maior intensidade em áreas ativadas pelo cérebro (FREUND et al., 2014). Além disso, de forma molecular, o estudo in vivo de Lundquist et al. (2019) demonstrou o aumento de expressão dos genes envolvidos com o processo de astrogliose reativa em áreas cerebrais que são ativadas durante o exercício físico (LUNDQUIST et al., 2019).

A verdade é que os circuitos, que orquestram de forma conjunta e região específica a comunicação neuronal, estão intimamente envolvidos com variações no fenótipo astrocitário. Este mesmo estudo também demonstrou que o exercício físico modifica a morfologia astrocitária ativamente, além de direcionar sua expressão gênica – e isso também envolve mudanças relativas ao tempo de exercício. Essas mudanças foram observadas em um modelo in vivo do Mal de Parkinson (LUNDQUIST et al., 2019). Já quando o exercício voluntário é realizado após uma isquemia cerebral, uma análise transcriptômica dos astrócitos exibiu 70 genes regulados negativamente que tem associação com a morfologia neuronal (YAMAGUCHI et al., 2023).

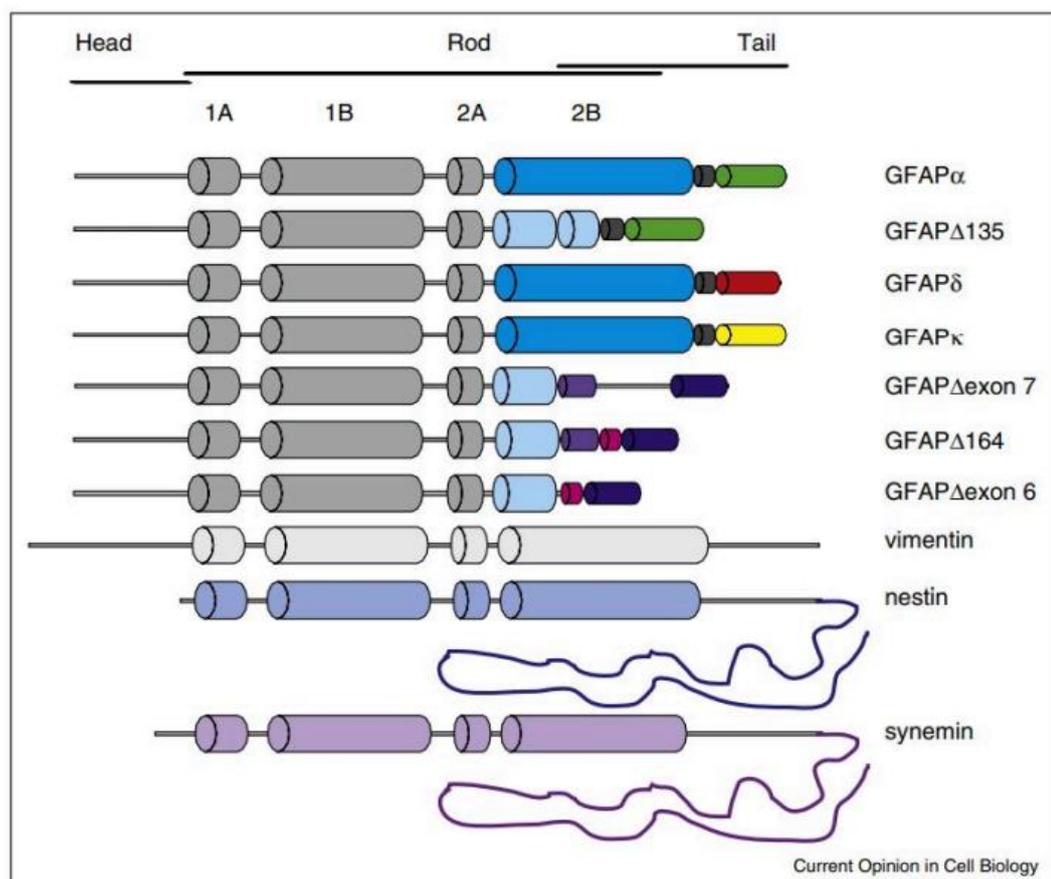


Figura 6: Filamentos intermediários encontrados nos astrócitos como vimentina, nestina e sinemina e as diferentes isoformas de GFAP descobertas (HOL & PEKONY, 2015)

A morfologia foi a chave do estudo astrocitário desde a descoberta do GFAP como biomarcador, mas ainda são poucos os estudos que se debruçam em investigar mecanismos de funcionalidade astrocitária associados com as variações de intensidade ou duração de exercício. Em um estudo anterior realizado por nosso grupo (DE SOUZA et al., 2020), roedores participaram de uma simulação de ultramaratona e exibiram uma variação negativa na expressão de GFAP-alfa, com aumento de isoformas variantes de peso molecular inferior, mesmo que acompanhados de 3 meses de treinamento prévio. Além disso, foi encontrado dano cerebelar pelos altos índices de estresse oxidativo.

Esse achado prévio, ligado a uma área motora como o cerebelo, abre uma porta que envolve a tentativa de compreender mecanismos relacionados com a reatividade astrogliar em insultos como esse, na busca de diferenciar mecanismos de plasticidade benéficos ou maléficos. Até onde a resposta astrocitária ao insulto pode resultar em neuroproteção? E em que ponto pode tornar-se uma reação neurotóxica? Além disso, o estudo prévio traz luz à busca da compreensão do exercício de elevada duração e de ultra exaustão na perspectiva do processo de plasticidade e adaptação.

A importância do córtex cerebral para o planejamento e estratégia envolvidos no controle motor e a sua relativa resistência a diferentes tipos de insultos bem como o fenótipo diferencial de astrócitos quando comparado à glia de Bergman do cerebelo, motivou o presente estudo. Em uma perspectiva comparativa, avaliando resposta antioxidante bem como a reatividade astrocitária e vias de sinalização induzidas pelo exercício de elevado volume e ultramaratona foram investigados.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar se o treinamento de elevado volume, associado ou não à ultramaratona, interfere na resposta antioxidante do córtex cerebral e em parâmetros neuroquímicos e vias de sinalização celular associadas à reatividade glial.

3.2. ESPECÍFICOS

- 1) Analisar os parâmetros indicativos da performance de corrida durante o treinamento e parâmetros relativos ao peso e consumo alimentar;
- 2) Investigar a resposta antioxidante do tecido cortical ao estresse, causado pelo treinamento e pelo teste de exaustão, analisando atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), NADPH oxidase, bem como os níveis de marcadores inflamatórios como o NO e a interleucina 1-Beta;
- 3) Avaliar o estado redox analisando níveis de GSH e GSSG;
- 4) Pesquisar o perfil de expressão das isoformas da proteína fibrilar ácida de glia (GFAP) para a compreensão do perfil de expressão astrocitária do córtex cerebral;
- 5) Identificar vias de sinalização celular que estão envolvidas com a resposta astrogliar e mecanismos de plasticidade e metaplasticidade.

4 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, Wickliffe C.; BEAR, Mark F. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends in neurosciences*, v. 19, n. 4, p. 126-130, 1996;

ALVES, M. D. DE J. et al. Changes in Cytokines Concentration Following Long-Distance Running: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Physiology*, Frontiers Media S.A, 2022;

ANDREWS, M. G. et al. mTOR signaling regulates the morphology and migration of outer radial glia in developing human cortex. *Elife*, v. 2, n. 9, 2020;

BALDELLI, S. et al. Glutathione and nitric oxide: Key team players in use and disuse of skeletal muscle. *Nutrients MDPI AG*, 2019;

BALTACI, Saltuk Bugra; MOGULKOC, Rasim; BALTACI, Abdulkерim Kasim. Molecular mechanisms of early and late LTP. *Neurochemical research*, v. 44, p. 281-296, 2019.

BAXTER, P. S.; HARDINGHAM, G. E. Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine Elsevier Inc.*, 2016.

BENEDETTI, S. et al. Impact of the 24-h ultramarathon race on homocysteine, oxidized low-density lipoprotein, and paraoxonase 1 levels in professional runners. *PloS one*, v. 13, n. 2, 2018.

BHATIA, T. N. et al. Astrocytes do not forfeit their neuroprotective roles after surviving intense oxidative stress. *Frontiers Mol. Neurosci*, v. 12, n. 87.

BORSATTO, J. E., & SPINELLI, N. C. Atletas de endurance e ultraendurance - uma investigação sobre efeitos da hiponatremia. **Journal of Physical Education**, 2017.

CALABRESE, V., et al. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*, v. 8, 766–775, 2007;

CAMILETTI-MOIRÓN, D. et al. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, v. 23, n.4, p. 202-212, 2013;

CAO, W. et al. Physical exercise-induced astrocytic neuroprotection and cognitive improvement through primary cilia and mitogen-activated protein kinases pathway in rats with chronic cerebral hypoperfusion. *Front. Aging Neuroscience*, v. 14, n. 866336, 2022;

CHALIMONIUK, M. et al. Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats. *J Physiol Pharmacol*, v. 66, n. 4, p. 539-547, 2015.

CONTRERAS-OSORIO F, RAMIREZ-CAMPILLO R, CERDA-VEGA E, CAMPOS-JARA R, MARTÍNEZ-SALAZAR C, REIGAL RE, HERNÁNDEZ-MENDO A, CARNEIRO L, CAMPOS-JARA C. Effects of Physical Exercise on Executive Function in Adults with Depression: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2022, p. 15270.

CURRIE, K. D. et al. Effects of resistance training combined with moderate-intensity endurance or low-volume high-intensity interval exercise on cardiovascular risk factors in patients with coronary artery disease. *Journal of Science and Medicine in Sport*, v. 18, n. 6, p. 637–642, 2015.

DE SOUZA, R. F. et al. Ultra-Endurance Associated With Moderate Exercise in Rats Induces Cerebellar Oxidative Stress and Impairs Reactive GFAP Isoform Profile. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 13, 2 set. 2020.

DZYUBENKO, E.; HERMANN, D. M. Role of glia and extracellular matrix in controlling neuroplasticity in the central nervous system. *Seminars in Immunopathology Springer Science*, 2023.

ESTRELA, A. L. et al. High-volume exercise training in older athletes influences inflammatory and redox responses to acute exercise. *Journal of Aging and Physical Activity*, v. 25, n. 4, p. 559–569, 2017.

FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, R. et al. Immediate effect of high-intensity exercise on brain-derived neurotrophic factor in healthy young adults: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Sport and Health Science*, Elsevier B.V., 2022.

FREUND, W et al. Substantial and reversible brain gray matter reduction but no acute brain lesions in ultramarathon runners: experience from the TransEurope-FootRace Project. *BMC Medicine*, v. 10, p. 170, 2012.

GOMEZ-CABRERA, M.; DOMENECH, E.; VIÑA, J.. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free radical biology and medicine*, v. 44, n. 2, p. 126-131, 2008.

GÓRECKA, M. et al. Effect of mountain ultra-marathon running on plasma angiotensin-like protein 4 and lipid profile in healthy trained men. *European Journal of Applied Physiology*, v. 120, p. 117-125, 2020.

HOL, E. M.; PEKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology Elsevier*, 2015.

HORTOBÁGYI, T. et al. The impact of aerobic and resistance training intensity on markers of neuroplasticity in health and disease. *Ageing Research Reviews Elsevier*, 2022.

HÖTTING, K.; RÖDER, B. Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2013.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim. Nova.* [s.l: s.n.].

ISKUSNYKH, I. Y. et al. Aging, Neurodegenerative Disorders, and Cerebellum. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 2, p. 1018, 2024.

JASTRZĘBSKI, Z. et al. Damage to liver and skeletal muscles in marathon runners during a 100 km run with regard to age and running speed. *J. Hum. Kinet.* 45, 93–102, 2015

JHA, M. K. et al. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation.” *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, v.. 25, n. 3, p. 227-240, 2019.

KNECHTLE, B.; NIKOLAIDIS, P. T. Physiology and pathophysiology in ultra-marathon running. *Frontiers in Physiology*, 2018a.

KNECHTLE, B.; NIKOLAIDIS, P. T. Physiology and pathophysiology in ultra-marathon running. *Frontiers in Physiology*, 2018b.

LI, D. et al. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *GLIA*, 2020.

LI, C. et al. Regulation of microglia phagocytosis and potential involvement of exercise. *Front. Cell. Neuroscience*, 2022, 16:953534.

LIANG, J. et al. Physical exercise promotes brain remodeling by regulating epigenetics, neuroplasticity and neurotrophins. *Reviews in the Neurosciences*, v. 32, n. 6, p. 615–629, 2021.

LIN, N. H. et al. Elevated GFAP isoform expression promotes protein aggregation and compromises astrocyte function. *FASEB Journal*, v. 35, n. 5, 2021.

LOPRINZI, Paul. The effects of exercise on long-term potentiation: A candidate mechanism of the exercise-memory relationship. *OBM Neurobiology*, v. 3, n. 2, p. 1-14, 2019.

LUNDQUIST, A. J. et al. Exercise induces region-specific remodeling of astrocyte morphology and reactive astrocyte gene expression patterns in male mice. *Journal of Neuroscience Research*, v. 97, n. 9, p. 1081–1094, 2019.

MATTSON, M. P. “Hormesis defined.” *Ageing research reviews*, v. 7, p. 1-7, 2008

MANG, Z. A. et al. Aerobic Adaptations to Resistance Training: The Role of Time under Tension. *International Journal of Sports Medicine*, 2022.

MILLET, G. Y.; MARTIN, V.; TEMESI, J. The role of the nervous system in neuromuscular fatigue induced by ultra-endurance exercise. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 2018.

- MRAKIC-SPOSTA, S. et al. Effects of mountain ultra-marathon running on ROS production and oxidative damage by micro-invasive analytic techniques. *PLoS ONE*, v. 10, n. 11, 2015.
- O'KEEFE, Evan L. et al. Training for longevity: the reverse J-curve for exercise. *Missouri medicine*, v. 117, n. 4, p. 355, 2020.
- PARUK, T. et al. Structural brain differences between ultra-endurance athletes and sedentary persons. *Sports Medicine and Health Science*, v. 2, n. 2, p. 89–94, 2020.
- PEDERSEN, B. STEENBERG, A. SCHJERLING, P. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *The Journal of physiology*, v. 536, n. 2, p. 329-337, 2001.
- POWERS, Scott K. et al. Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *Journal of sport and health science*, v. 9, n. 5, p. 415-425, 2020.
- RADAK, Z. et al. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res. Rev.* 7, 34–42, 2008
- REN, X. et al. Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2017.
- STARKIE, Rebecca et al. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin- induced TNF- α production in humans. *The FASEB Journal*, v. 17, n. 8, p.1-10, 2003.
- SINGIN, R. O. DUZ, S. KIRAZ, M. Cortical and subcortical brain volume alterations following endurance running at 38.6 km and 119.2 km in male athletes. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, v. 27, 2021.
- SKINNER, S. et al. Differential impacts of trail and ultra-trail running on cytokine profiles: An observational study. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, v. 78, n. 3, p. 301–310, 2021.
- SOFRONIEW, Michael V. Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity. *Trends in immunology*, v. 41, n. 9, p. 758-770, 2020.
- VIGH-LARSEN, J. F. et al. Muscle Glycogen Metabolism and High Intensity Exercise Performance: A Narrative Review. *Sports Medicine Springer Science*, 2021.
- WANG, F. et al. Effects of exercise-induced ROS on the pathophysiological functions of skeletal muscle. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2021, p. 1-5, 2021.
- WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2010.
- WOOD, K. N. et al. Impact of Long-Term Endurance Training vs. Guideline-Based Physical Activity on Brain Structure in Healthy Aging. *Front. Aging Neurosci*, v. 8:, p. 155, 2016

WU, G. L.. et al. Exhaustive swimming exercise-related kidney injury in rats - protective effects of acetylbritannilactone. *Int. J. Sports Med*, v. 33, p. 1–7 2012

YAMAGUCHI, N. et al. Voluntary running exercise modifies astrocytic population and features in the peri-infarct cortex. *IBRO Neuroscience Reports*, v. 14, p. 253–263, 2023.

5 ARTIGO (a ser submetido)**Ultra-maratona após treinamento de elevado volume induz mecanismos similares a metaplasticidade no córtex cerebral de ratos**

Lílian Vanessa da Penha Gonçalves¹, Arthur Vinicius da Silva Cabral¹, Ângela Amancio dos Santos¹, Daniele de Souza Andrade¹, Fernanda Priscila Barbosa Ribeiro¹, Marry Aneyts de Santana Cirilo¹, Ana Cristina Falcão Esteves², Raphael Fabricio de Souza³, Belmira Lara da Silveira Andrade-da-Costa¹

1. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

2. Departamento de Anatomia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

3 Departamento de Educação física, Federal University of Sergipe, São Cristovão, Brazil.

4 Group of Studies and Research of Performance, Sport, Health and Paralympic Sports – GEPEPS, Federal University of Sergipe, São Cristovão, Brazil;

Corresponding author: Dr. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Departamento de. Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária,
Recife, Pernambuco, Brasil CEP 50670-901

Phone: 55-81- 21268530

FAX: 55-81-21268976

E-mail: bl@ufpe.br or belmira@gmail.com

5.1 RESUMO

A corrida de ultramaratona (UER) tem sido associada a alterações transitórias no desempenho cognitivo e volume cerebral. Anteriormente, demonstramos que o treinamento de corrida de alto volume (EV) em roedores, sob intensidade moderada, induziu estresse oxidativo cerebelar. Quando esse treinamento foi seguido por um teste de exaustão (TE) simulando a UER, modificações no perfil de isoformas GFAP sugeriram comprometimento da reatividade dos astrócitos. O presente estudo investigou se essa vulnerabilidade oxidativa e astrogliosa ocorre no córtex cerebral (Cx). Quarenta e cinco ratos machos adultos foram divididos em quatro grupos de acordo com o EV e TE: controle (C), controle+TE (CET), EV e EV-ET. O período de treinamento foi de até 90 min/dia, 5 vezes/semana durante 3 meses (velocidade de 12 m/min). Homogenizados do Cx foram obtidos para análises do perfil de isoformas da GFAP, níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS), óxido nítrico (NO), GSH, GSSG, IL1b, ERK1/2 e JNK1/2 total e fosforiladas e atividades de NADPHoxidase, superóxido dismutase e catalase. O treinamento de EV aumentou as atividades da SOD e CAT e efeito aditivo do TE foi evidenciado na 52 CAT nos grupos CT e EV e na SOD no grupo CT. A razão GSH/GSSG aumentou nos grupos EV e CT-TE e os níveis de NO foram reduzidos no grupo EV; e aumentados no grupo CT-TE. EV aumentou níveis da IL-1b mas não o TE. Os níveis de EROS aumentaram apenas no grupo CT-TE. Similaridade inter-grupo ocorreu na atividade da NADPH oxidase. A razão p-ERK1/2 /ERK1/2 total foi reduzida pelo EV mas não pelo TE. Porém, os níveis da p-JNK-2 e a razão p-JNK-2/total-JNK foram aumentados pelo TE. Níveis das isoformas de GFAP de 39, 45, 50 e 55 KDa foram magnificados pelo EV mas revertidos aos valores do controle no grupo EVTE. O Cx apresenta resiliência ao dano oxidativo provocado pelo EV aumentando atividade de enzimas antioxidantes, o balanço redox e reduzindo níveis de NO. Redução nos níveis da p-ERK1/2 sem mudança na p-JNK ocorreu simultaneamente ao aumento na expressão de todas as isoformas de GFAP. A maioria das respostas induzidas pelo EV foram revertidas pelo TE, havendo aumento na p-JNK2. Dados sugerem que mecanismos similares a metaplasticidade podem ser induzidas pela ultramaratona após o treinamento EV.

Palavras-chave: ultra-exaustão; astrogliose; inflamação; exercício de elevado volume

5.2 INTRODUÇÃO

A ultramaratona vem sendo cada vez mais procurada pelos atletas em busca de desafios (JASTRZĘBSKI, et. al., 2015). Mesmo diante de uma intensidade moderada, como geralmente é praticado, ainda há questões e resultados inconclusivos quanto aos efeitos de elevados volumes de exercício (O'KEEFE et al., 2020).

Os resultados sistêmicos das ultramaratonas geralmente indicam fadiga fisiológica nos indivíduos. O dano muscular e o acometimento renal são alguns dos principais efeitos (JASTRZĘBSKI et al., 2015). Estudos indicam uma redução de longevidade envolvendo atletas de ultramaratona (O'KEEFE et al., 2020).

Alterações no desempenho cognitivo, humor e no volume cerebral vem sendo relatados como consequência de ultramaratonas em humanos (ANGLEM et al., 2008; FREUND et al., 2014; WOOD et al., 2016; KROKOSZ et al., 2020; SINGIN et al., 2021).

Sabe-se que a vulnerabilidade das diferentes regiões cerebrais ao exercício físico é variável (CHALIMONIUK et al., 2015). Regiões cujos volumes foram reduzidos ou aumentados pós-ultramaratona são associadas com o movimento e o planejamento motor (FREUND et al., 2014; SINGIN et al., 2021). Mesmo assim, poucos estudos investigaram os efeitos do exercício de elevado volume no metabolismo do sistema nervoso central.

Um estudo prévio realizado pelo nosso grupo investigou as repercussões do treinamento aeróbico de moderada intensidade e elevado volume (EV) por 3 meses, associados ou não a uma corrida de ultramaratona, no cerebelo de ratos adultos. Os resultados evidenciaram estresse oxidativo induzido pelo EV e mudança no perfil de isoformas proteicas de GFAP após a ultramaratona, sugestivas de redução na reatividade astrocitária (DE SOUZA et al., 2020). O cerebelo é caracterizado pela presença de células da glia de Bergmann, cuja função primordial envolve a migração dos neurônios cerebelares e a poda sináptica, astrócitos protoplasmáticos localizados na camada granular e astrócitos fibrosos localizados na substância branca. Essas células diferem dos astrócitos presentes no córtex cerebral (LEE et al., 2022), cuja resiliência a danos oxidativos vem sendo descrita como maior que a do cerebelo mesmo diante de alterações nos níveis de oxigênio (WANG et al., 2009) ou após indução de estresse oxidativo por pesticidas como o Paraquat (BHATIA et

al., 2019). Além disso, as células cerebelares exibiram uma maior expressão de genes associados com o dano oxidativo (WANG et al., 2009).

A principal motivação do presente estudo considera que: a) pouco se conhece a respeito dos acometimentos de extremos volumes de corrida nas células astrocíticas no SNC de forma geral, b) há consideráveis 54 questionamentos a respeito dos potenciais danos fisiológicos de ultra corridas para o sistema nervoso, c) a aplicação deste conhecimento tem relevância também na compreensão de mecanismos biomoleculares ligados a reatividade glial. Assim, o nosso principal objetivo é questionar se elevados volumes de corrida em condições de intensidade moderada são capazes de ativar positivamente o perfil redox e inflamatório cerebral, além do fenótipo neuroquímico astrocítico. Visa também entender potenciais mecanismos de neuroplasticidade relacionados à prática subsequente de uma prova de ultramaratona.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 *Animais*

Quarenta e cinco ratos machos Wistar de 60 dias foram obtidos na unidade de produção animal da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil, sob a aprovação e diretrizes para Uso de Animais de Laboratório previamente aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (CEUA) (0048/2023).

As condições de acomodação destes roedores incluíram: ciclo claro-escuro de 12 horas sob fotoperíodo inverso (luzes acesas às 18 horas), em ambiente controlado com temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e tiveram livre acesso a alimentação e água.

Antes do treinamento, foi realizado um teste de treinabilidade que conseguiu randomizar os animais em 2 grupos: controle (colocados na esteira mesmo desligada), elevado volume (que percorreram, no fim do treinamento, até 90 min/dia de treinamento). A partir disso, esses grupos foram subdivididos em: controle (CT: n = 7, colocados na esteira mesmo desligada), CT com teste de exaustão (CT-TE: n = 7), elevado volume (EV: n = 7), EV com TE (EV-TE: n = 7).

5.3.2 Protocolo de Treinamento

Uma semana antes do início do treinamento, todos os animais foram adaptados à esteira para ratos a uma velocidade de 5 m/min durante 10 min. Utilizou-se uma esteira motorizada (produtos AVS ®) com pistas individuais, equipada com amortecedor e choque traseiro (2,0 mA). O choque traseiro não ultrapassou 0,5 mA e foi utilizado apenas no período de adaptação como forma de condicionar os ratos.

Os animais foram randomizados a partir do teste de treinabilidade. O teste de treinabilidade em esteira foi avaliado em uma escala de 1 a 5 de acordo com os seguintes critérios: (1) recusa em correr, (2) corredor abaixo da média (corre esporadicamente, mas para de correr constantemente), (3) corredor médio (mantém uma corrida constante, mas cai ou para de correr esporadicamente), (4) corredor acima da média (corredor consistente, ocasionalmente cai para trás na esteira) e (5) bom corredor (Dishman et al., 1988). Os animais classificados com escore ≥ 3 foram randomizados nos grupos específicos de treinamento. Apenas dois animais pontuaram < 3 , e esses animais foram retirados pois não foram considerados hábeis para a performance necessária.

TABLE 1 | Training protocol.

Week	Training threshold (%-m/min)	Time (Min)	Frequency of weekly sessions	Recovery training (hours)	
		HV			
Adaptation	1°	5 m/min	10 min	3x	24
	2°	50%	10 min	3x	24
1°Phase	3°	50%	20 min	3x	24
	4°	50%	30 min	3x	24
	5°	50%	40 min	5x	24
	6°	50%	50 min	5x	24
2°Phase	7°	60%	60 min	5x	24
	8°	60%	70 min	5x	24
	9°	60%	80 min	5x	24
	10°	70%	90 min	5x	24
3°Phase	11°	70%	90 min	5x	24
	12°	70%	90 min	5x	24

MV, moderate-volume training; HV, high-volume training.

Tabela 1. Protocolo de treinamento. Adaptado de Souza et al (2021).

Depois da adaptação, os animais foram submetidos a um teste de velocidade máxima para determinar um limiar de intensidade moderada para o treinamento.

Nesse teste de VMáx, houveram incrementos de velocidade (5m/min a cada 3min) em uma corrida gradativa de limiar, começando em 5m/min até a velocidade máxima alcançada por animal. A partir disto, foi definida a velocidade média por animal que ficou entre 50- 70% da VMáx, para evitar induzir uma possível anaerobiose.

O protocolo de treinamento ocorre de forma gradativa e contínua por 12 semanas. Cada sessão de treinamento foi precedida de 5 min de aquecimento no início da corrida e tendo 5 min de recuperação ao final da corrida - em média, 30% da VMáx. Os animais tiveram de 3 a 5 sessões de 56 treinamento por semana de intensidade baixa a moderada (50-70% da intensidade máxima alcançada pelo animal no teste de Vmáx), caracterizando os grupos EV e EV-TE, aumentando o tempo de forma gradativa de 10 para 90 minutos por dia ao longo das 12 semanas. Vinte e quatro horas após o treinamento, os grupos CT-TE e EV-TE foram submetidos ao teste de exaustão. A intenção de associar o TE ao grupo CT envolve a compreensão do TE de forma isolada. Esse teste busca induzir uma simulação de ultramaratona, sendo realizado até a distância máxima de corrida de cada animal até que ele se recuse a correr (como indicador, usamos o toque na caixa de corrida 10 vezes por 1 min). A intensidade usada na corrida foi de baixa à moderada.

Após 24h do treinamento, os animais do grupo CT e EV foram pesados, eutanasiados e anestesiados com isoflurano 100% para decapitação e remoção imediata do córtex cerebral. Após 24h do TE, os animais do grupo CT-TE e EV-TE também foram eutanasiados para a remoção e homogeneização cortical.

5.3.3 Análise de desempenho na corrida

Para análise do desempenho de corrida, foram avaliados: velocidade máxima (metros/min) e um protocolo indicador de performance (modificado) chamado de sistema AEY, que é definido em pontos (RíosKristjánsson, et al. 2019). O sistema AEY fornece um parâmetro semiquantitativo para analisar a performance de corrida de cada rato, sendo analisado três vezes numa corrida (no início, meio e fim), numa pontuação entre 0 a 1 de acordo com cada variável (A, E e Y). No estudo, apenas o parâmetro A foi utilizado devido à uma limitação protocolar relacionado ao funcionamento da esteira. Na variável A, investigamos o posicionamento do rato na esteira e sua forma de corrida para reduzir variações biológicas na adaptação de cada um desses animais (Ríos-Kristjánsson, et al. 2019)

5.3.4 Análise bioquímica do perfil antioxidante cortical

5.3.4.1 Preparação de tecido

A dissecação do córtex (ambos os hemisférios) foi feita utilizando-se salina gelada. O peso úmido foi obtido após retirada do excesso de líquido em papel toalha, seguida de imersão imediata do córtex em 1ml de solução salina para manutenção no freezer a -80°C . Em seguida, este tecido foi homogeneizado de forma mecânica a 4°C num tampão de lise contendo 50mM Tris (pH 7.4) contendo 0.5 mM EGTA, 1mM fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), 1mM ortovanadato, 1% nonidet e 1% 57 coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich). O homogenato resultante foi centrifugado por 10 min a 10.000 g a 4°C e os sobrenadantes armazenados a -80°C para análises posteriores.

5.3.4.2 Análise de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Os níveis relativos de EROS gerados foram analisados por fluorimetria utilizando o diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA ou DCFDA). Essa molécula não fluorescente pode ser livremente difundida pelas membranas celulares. Quando internalizada, o grupo diacetato é clivado pelas esterases. O produto é convertido em um metabólito altamente fluorescente DCF na presença de EROS. Na análise, é feita uma diluição de 1:1 de amostra e reagente DCFDA numa placa de 96 poços. Essa reação é incubada por 30 min em 37°C . A fluorescência foi mensurada em 504nm de excitação e 529nm de emissão. Os valores foram exibidos em unidades de fluorescência por miligrama de proteína (RLU/mg).

5.3.4.3 Análise estimativa dos níveis de óxido nítrico (NO)

Os níveis de nitrito foram mensurados a partir da utilização do reagente de Griess (Sigma-Aldrich) de acordo com o descrito por Nijmeh et al. (2018) como um indicador de produção de NO. Volumes iguais de amostra (100uL) e de reagente de Griess foram colocados em placas de 96 poços e reagiram por 10 min em temperatura ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C}$). A mensuração da absorbância do composto

diazônio foi realizada em um comprimento de onda de 540nm. Uma curva padrão com concentrações previamente conhecidas de nitrito de sódio foi utilizada como referência para a definição dos resultados, que foram expressos como nmol por mg de proteína.

5.3.4.4 Atividade total de superóxido dismutase (SOD)

A avaliação da atividade enzimática superóxido-dismutase total (tSOD) foi descrita por Green et al. (1982). Sobrenadantes de córtex (60uL) em triplicata foram previamente incubados em banho-maria a 37°C. Foi adicionado 920µL de tampão de carbonato de sódio a 0,05% pH 10,2 EDTA 0,1mM. A reação iniciou-se ao adicionar 20uL de epinefrina 150mM em ácido acético a 0,05%. A análise cinética do decaimento da atividade da enzima foi vista a partir de alterações de absorvância por 15 s durante um total de 2 min, sendo medidos num comprimento de onda de 480nm. Visto que uma unidade de SOD é o suficiente para causar 50% de inibição da oxidação da epinefrina, a atividade enzimática cortical de t- 58 SOD foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

5.3.4.5 Atividade enzimática da catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase (CAT) também foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U/mg de proteína) (MISRA e FRIDOVICH, 1972). Da mesma forma, triplicatas de sobrenadantes corticais (60uL) foram diluídas com 905uL de tampão de fosfato de sódio pH 7,0. A adição de 35 µl de peróxido de hidrogênio 300 mM em tampão fosfato de sódio inicia a reação. A mensuração é feita a partir da taxa de decomposição de H₂O₂ pela reação da enzima CAT, sendo analisada a partir da constante da taxa k que foi de 2.3 levando em conta as condições de experimentação (pH: 7,0; temperatura: 22°C). As mudanças de absorvância foram medidas a cada 10s, por 1.5s a 240nm de comprimento de onda.

5.3.4.6 Níveis de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de glutathiona reduzida foram mensurados tendo como referência uma curva padrão construída com concentrações previamente conhecidas de GSH

utilizando o protocolo descrito por Hissin and Hilf, 1976. As amostras são diluídas com tampão fosfato 100 mM com EDTA (5 mM) (pH 8,0) (450uL de tampão/50uL de amostra). Na placa de 96 poços, é adicionada em triplicata 50uL dessa mistura, 140uL de tampão fosfato a 100mM e 10 µL de soluções de o-phthaldialdehyde (OPT). As placas foram incubadas em ambiente protegido da luz a temperatura ambiente durante 15min. A leitura da absorbância foi feita em espectrofluorímetro com comprimento de onda de 350nm e os resultados foram expressos em umol por mg de proteína.

5.3.4.7 Níveis de glutathiona oxidada (GSSG)

Os níveis de GSSG também foram mensurados a partir de um protocolo descrito por Hissin and Hilf, (1976), onde o sobrenadante foi incubado a temperatura ambiente com 20uL de N-etilmaleimida (NEM) 0,04M durante 30min para interagir com o GSSG presente no tecido. Diluída com 430 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M (50uL de + 20uL de NEM+430uL de NaOH 0,1M), 50 µL dessa mistura, 140 µL de NaOH 0,1 M e 10 mL OPT foram colocados nos poços de uma placa de 96 poços. Os resultados foram mensurados a partir de uma curva padrão de concentração com valores prévios conhecidos de GSSG, sendo expressos em µmol por mg de proteína. A leitura foi feita em espectrofluorímetro com comprimento de onda de 350nm.

5.3.5 Análises de expressão proteica cortical

Os homogenatos foram centrifugados a 1000 g a 4 °C por 10 min e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C. Amostras de homogenatos corticais foram diluídos em tampão de amostra e fervidos por 5 min. Quarenta microgramas de proteína por poço foram separados eletroforeticamente em gel de poli-acrilamida-dodecil sulfato de sódio 15% contendo 10% de SDS, 30% solução de acrilamida/bis-acrilamida, 1.5M TRIS-HCl (pH 8.8), e 10% APS, TEMED a 100V, 0,15A e 300 W. Depois da separação, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (Malne Manufacturing, SA, 0.22micron) durante 1 h e 30min a 250V, 0,35A e 300W. As membranas foram bloqueadas por 1h em solução de Tris-Tween 20 (TBS-T) contendo 5% de BSA.

Em seguida, foram encubadas com anticorpo primário policlonal coelho anti-GFAP (Dako Germany, 1:1000), policlonal coelho anti-IL-1 β (Sino Biological Inc, Beijing, China, 1:2000), anti p-ERK, anti-ERK total, anti p-JNK, anti-JNK total (Santa Cruz Biotechnology) diluído em TBS-T overnight a 4 ° C. Após lavagens (3 vezes, 10min cada) em TBS-T, as membranas que foram incubadas com anticorpo primário coelho, foram tratadas com anticorpo secundário anti-coelho (Jackson ImmunoResearch, USA; 1: 20.000) ou anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, USA; 1: 20.000) diluído em TBS-T durante 2 horas. Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBS-T e coradas com reagente Luminata (Millipore, USA) via quimioluminescência usando um sistema de imagem ChemiDoc (Bio-Rad, USA). Posteriormente, anticorpos anti-B-actina monoclonal (CLOUD, 1:2.000) e anticorpo secundário anti-coelho (Jackson ImmunoResearch, USA; 1: 20.000) foram utilizados. As figuras digitalizadas das bandas foram analisadas pelo programa Image Lab 6.0.1 (Bio-Rad,USA). Os níveis de GFAP e IL1- β foi normalizado aos valores quantitativos da proteína beta-actina. Os níveis de p-ERK foram normalizados pelos valores quantitativos de ERKtotal, e os de p-JNK pela JNK-total ou pela beta actina. As isoformas de GFAP foram analisadas separadamente e individualmente para a obtenção dos dados. A intensidade das bandas foi medida por densitometria.

5.3.6 Análise estatística

O teste Shapiro Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. As comparações entre os grupos foram feitas pela análise de variância ANOVA de duas vias (two-way), com análise de múltiplos fatores interagindo entre os grupos (tipo de treinamento vs. teste de exaustão). Quando apropriado, combinações post-hoc foram realizadas usando o teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. O programa Graphpad Prism (versão 10.0) foi utilizado, considerado valor de significância $p \leq 0,05$.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Parâmetros da corrida

O consumo de ração não variou entre os grupos (Figura 1A). Na 12ª semana, animais do grupo EV tiveram uma significativa redução de peso em relação ao grupo CT, como vemos na figura 1B e 1C. O peso dos animais de diferentes grupos foi crescendo de acordo com o tempo, obedecendo ao ganho de peso e a curva de crescimento relativa à idade (Figura 1B-C).

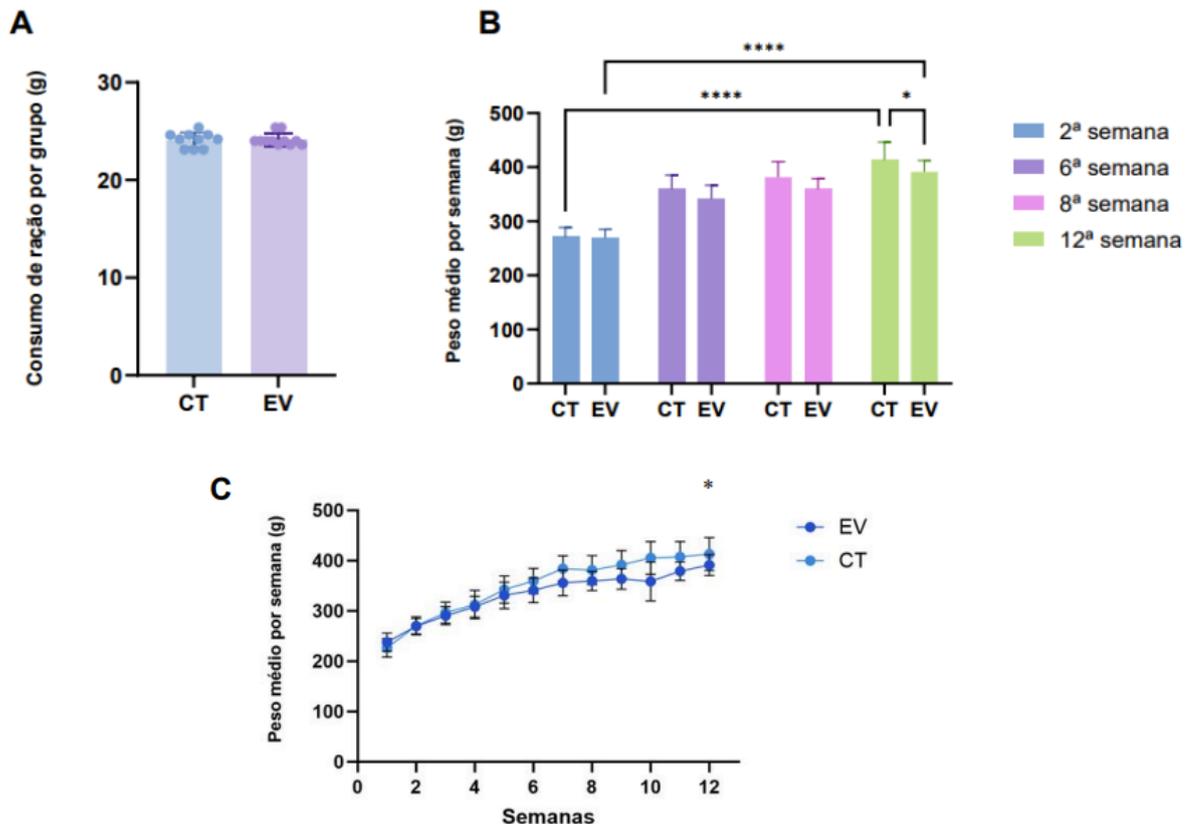


Figura 1: Parâmetros de corrida por grupo. (A) Consumo de ração por grupo durante o período de treinamento (B) Peso médio (g) por semana em 12 semanas. (C) Linha de tendência de peso médio dos animais por semana em 12 semanas. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Com relação à velocidade máxima, o grupo CT teve diferença apenas entre o primeiro e o segundo teste, com um desvio padrão notável devido à variação biológica envolvida na falta de adaptação dos animais na esteira quando comparado com o EV (Figura 2A). Como esperado, os animais do grupo EV tiveram um desempenho superior na sequência de testes de velocidade máxima do que o grupo controle (não exibido, 1^o-3^o, EV-EV $p = 0.094$), tendo diferença significativa entre os grupos CT e EV em todos os testes de velocidade máxima ($p = 0.043$) (Figura 2A).

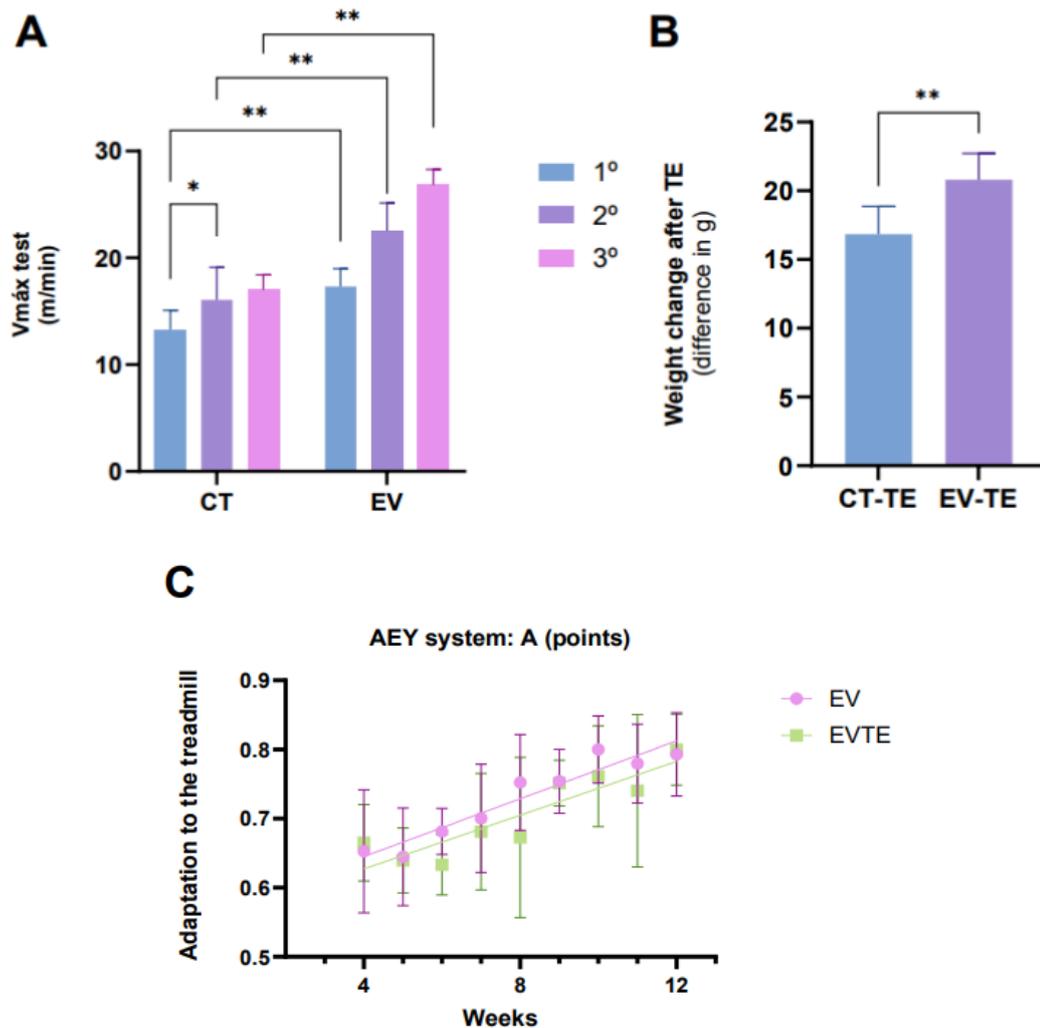


Figura 2: Parâmetros de corrida por grupo. (A) Variação nas 3 pontuações em m/min do teste de velocidade máxima por grupo. (B) Variação de peso nos animais que realizaram o TE. Pesagem realizada antes e pós TE. Resultado da diferença entre as duas (diferença em g). (C) Pontuação do sistema AEY: A. Análise da adaptação de cada rato à esteira em 12 semanas. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Com relação à velocidade máxima, o grupo CT teve diferença apenas entre o primeiro e o segundo teste, com um desvio padrão notável devido à variação biológica envolvida na falta de adaptação dos animais na esteira quando comparado com o EV (Figura 2A). Como esperado, os animais do grupo EV tiveram um desempenho superior na sequência de testes de velocidade máxima do que o grupo controle (não exibido, 1°-3°, EV-EV $p = 0.094$), tendo diferença significativa entre os grupos CT e EV em todos os testes de velocidade máxima ($p = 0.043$) (Figura 2A).

O grupo EV-TE teve uma maior perda de peso, com diferença de um dia, depois do último treinamento e após o teste de exaustão, comparado com o grupo CT-TE (Figura 2B). Isso pode estar relacionado com o maior tempo de exaustão que o grupo EV levou ao se

manter na esteira. Para analisar a adaptação à esteira de cada animal de forma individual, RíosKristjánsson, J. G. et al. (2019) mostrou um protocolo que permite quantificar a adaptação do animal de acordo com seu comportamento na esteira. A pontuação A, que foi a que utilizamos em um protocolo adaptado, nos permite definir a corrida de cada rato em pontos que vão de 0 à 1. Como vemos na figura 3D, o grupo EV teve uma boa evolução no período de adaptação, chegando perto da pontuação ideal de treinamento ao fim das 12 semanas. Os roedores possuem um padrão biológico diferente do exigido no treinamento de elevado volume, visto que o exercício padrão realizado por roedores são corridas curtas e rápidas para fugir de predadores (Ríos-Kristjánsson, et al. 2019). O gráfico demonstra que os animais foram bem adaptados ao exercício praticado, mesmo com a variação biológica intrínseca de cada um (FIGURA 2C).

5.4.2 Efeitos do EV com e sem TE sobre a resposta oxidativa do córtex cerebral

Houve elevação significativa da atividade da enzima SOD no grupo EV em relação ao CT ($p=0.0008$) e do CT-TE em relação ao CT ($p<0.0001$), (Figura 4A). A CAT foi superior nos grupos de TE em relação ao seu respectivo controle (CT vs. EV, $p=0.0025$; CT-TE vs. EV-TE, $p=0,0211$), de forma independente do teste de exaustão (Figura 4B).

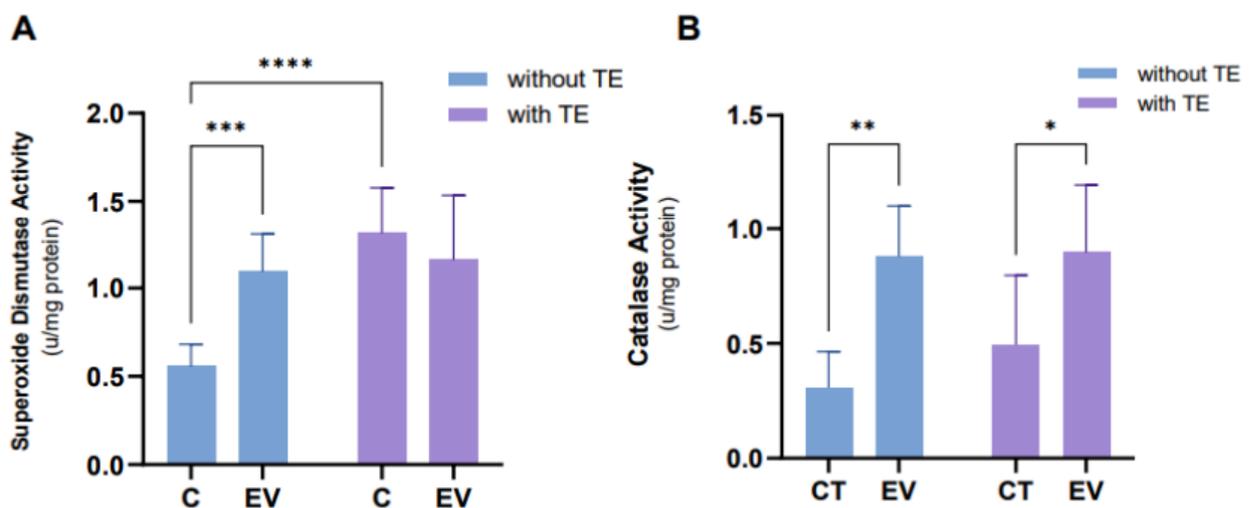


Figura 4: Resposta antioxidante cortical. (A) Níveis da atividade de superóxido dismutase (u/mg de proteína). (B) Níveis de atividade da catalase (u/mg de proteína). * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

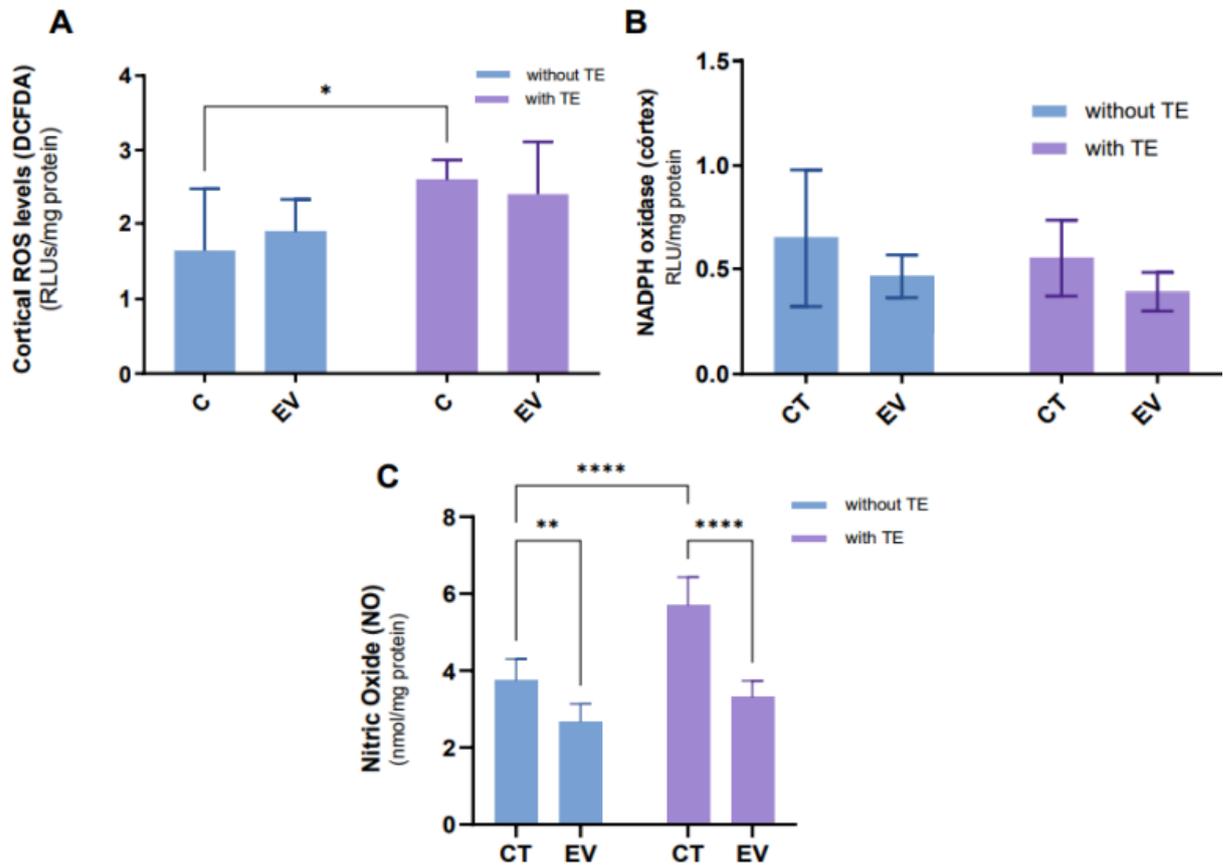


Figura 5: Resposta antioxidante cortical. (A) Níveis da atividade de superóxido dismutase (u/mg de proteína). (B) Níveis de atividade da catalase (u/mg de proteína). (C) Níveis de NO (nmol/mg proteína). $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$

O DCFDA é um biomarcador de níveis de espécies reativas de forma inespecífica, ou seja, é capaz de identificar qualquer aumento nos níveis de espécies reativas, seja nitrosativa ou oxidativa. Os níveis de EROS foram encontrados elevados no córtex no grupo CT-TE em comparação ao grupo CT ($p=0.0384$), o que não ocorreu nos grupos EV e EV-TE. Ou seja, não foi encontrado um nível de estresse oxidativo significativo relativo ao TE quando treinado previamente (Figura 5A). Por outro lado, a atividade da NADPH oxidase não variou de forma significativa em nenhum dos grupos (Figura 5B). Os níveis de NO foram reduzidos pelo treinamento de elevado volume ($p<0.01$) em relação ao grupo CT. Em relação aos efeitos do TE, houve um aumento pelo TE no grupo controle, mas não no grupo EV ($p<0.0001$) (Figura 5C).

Os níveis de glutatona oxidada (GSSG) no CT-TE reduziu em relação aos níveis do controle ($p=0.0372$). Os níveis de GSH não alteraram entre si, mas na razão entre GSH/GSSG tivemos um aumento nos níveis de GSH tanto no EV em

relação ao controle ($p=0.0272$), como no CT-TE em relação ao controle ($p=0.0020$) (Figura 6).

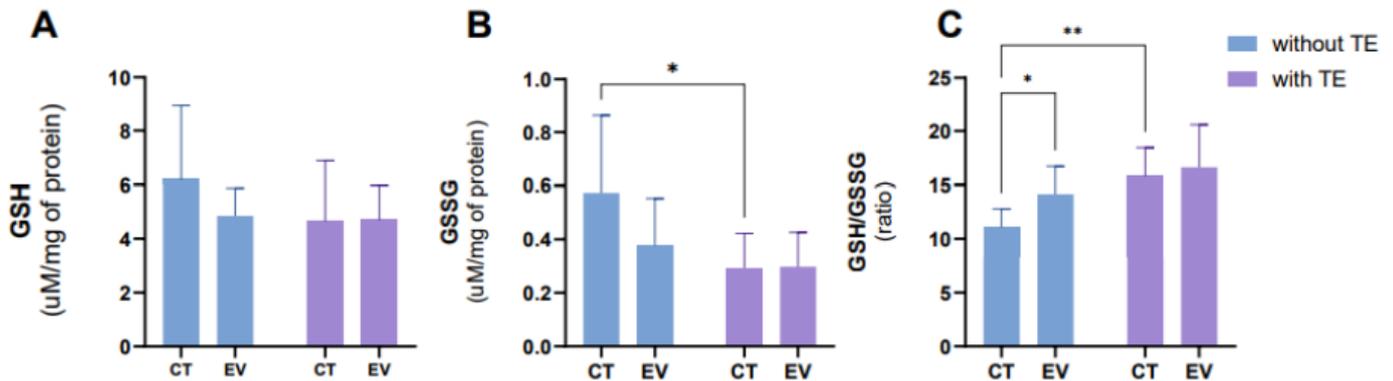


Figura 6: Resposta da glutatona cortical. (A) Níveis de glutatona reduzida expressa em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. (B) Níveis de glutatona oxidada expressa em $\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína. (C) Razão entre os níveis de GSH/GSSG. $p \leq 0,05$; $**p < 0,01$;

5.4.3 Efeitos do exercício de EV com e sem TE sobre níveis de IL-1 β

Os níveis de pró-IL-1 β não variaram entre si, porém os níveis IL-1 β foram aumentados pelo TE no grupo controle ($p= 0.0312$), mas não no grupo EV-TE. Inclusive, houve uma redução dos níveis de IL-1 β no EV-TE comparado ao EV que não teve o treinamento de exaustão ($p = 0.0256$) (FIGURA 7).

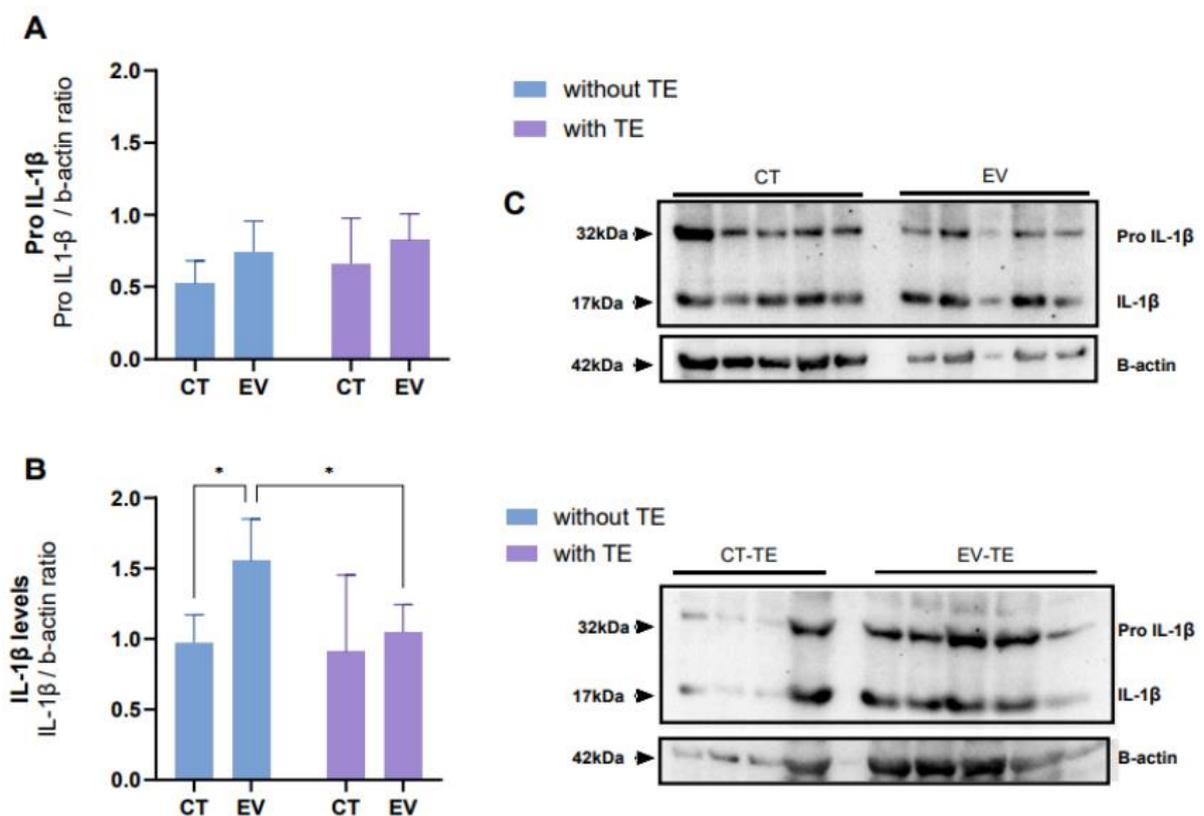


Figura 7: Resposta inflamatória. (A) Níveis de pró-IL1-B. (B) Níveis de IL1-B. (C) Imagem de western-blotting de ambas isoformas e normalizador. $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Os dados foram normalizados pelos níveis de B-actina. Os valores representam média \pm DP num N de 3 experimentos independentes por grupo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.4.4 Efeitos do exercício de EV com e sem TE sobre o perfil de expressão das isoformas de GFAP

Em relação a isoforma de 39kDa, que contribui para um fenótipo mais imaturo do GFAP, tivemos um aumento no grupo EV em relação ao CT (EV vs. CT, $p=0.0117$) e em relação a EV-TE (EV vs. EV-TE, $p=0.0018$) (Figura 8A). Isso também aconteceu na isoforma de 50kDa (CT vs. EV, $p=0.0272$; EV vs. EV-TE, $p=0.0234$) (Figura 8B). A isoforma de 55kDa, que tem sua proliferação associada com um perfil de astrogliose, teve um aumento apenas no grupo EV em relação ao controle (CT vs. EV, $p=0,0062$) (Figura 8C), assim como foi observado na isoforma de 42kDa (CT vs. EV, $p=0,0256$) (Figura 8D). Ou seja, o nível das isoformas proteicas de GFAP aumentou no grupo EV, mas retornou aos valores do CT no grupo EV-TE (Figura 8).

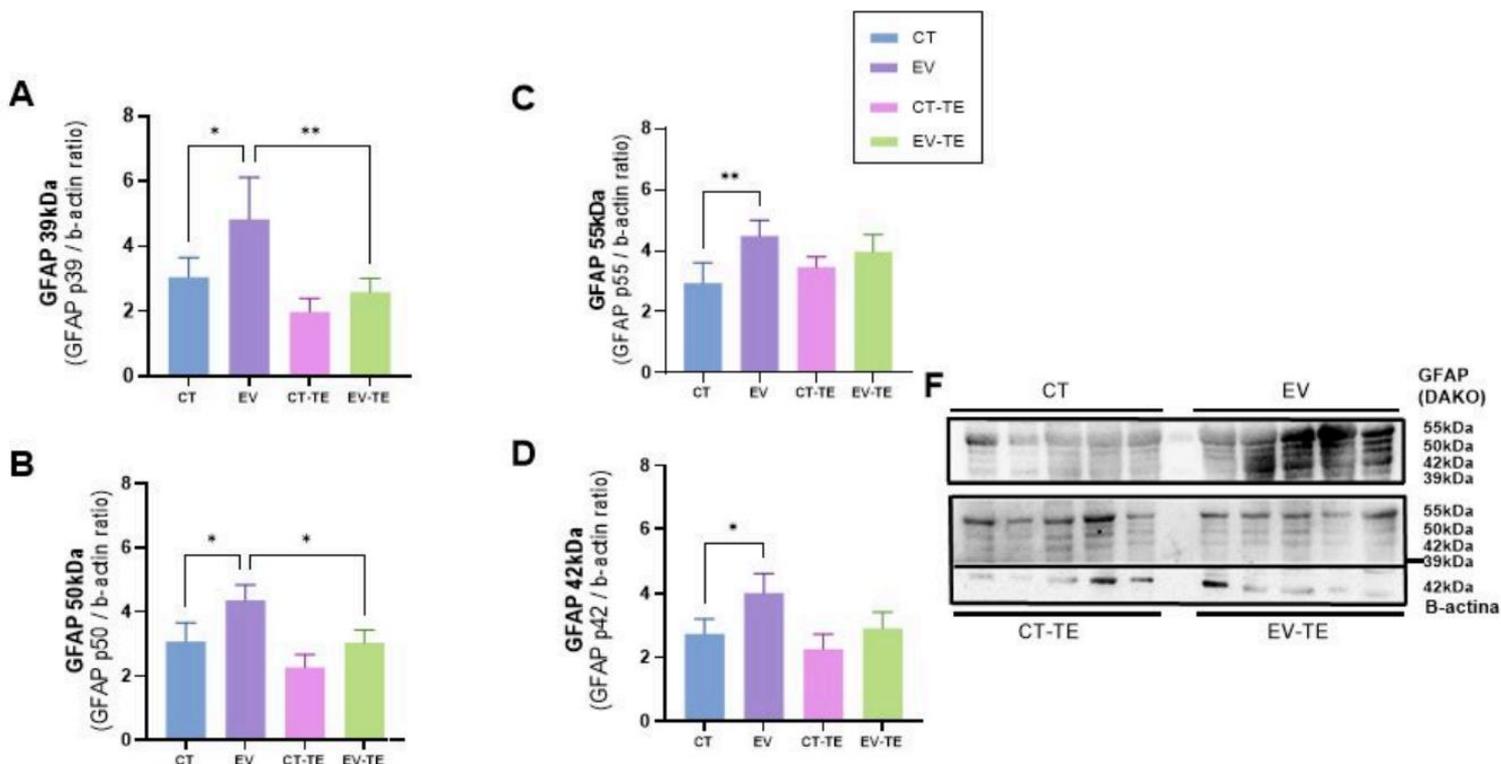


Figura 8: Perfil de expressão de GFAP no treinamento de EV com ou sem TE. (A) Níveis da isoforma de GFAP de 39kDa. (B) Níveis da isoforma de GFAP de 50kDa. (C) Níveis da isoforma de GFAP de 55kDa. (D) Níveis da isoforma de GFAP de 42kDa. (E) Imagem de western-blotting de isoformas e normalizador. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$. Os dados foram normalizados pelos níveis de B-actina. Os valores representam média \pm DP num N de 3 experimentos independentes por grupo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.4.5 Efeitos do exercício de EV e TE nas vias de sinalização celular envolvidas com diferenciação astrocitária e outros mecanismos de plasticidade

A razão de ERK fosforilada/ERK total buscou analisar a atividade da via da ERK, que está envolvida com diferenciação e com alterações no perfil de isoforma de GFAP. Como vemos na figura X, os níveis de ERK fosforilada/ERK total foram reduzidos pelo EV (CT vs. EV, $p=0.047$) mas não afetados pelo TE (Figura 9).

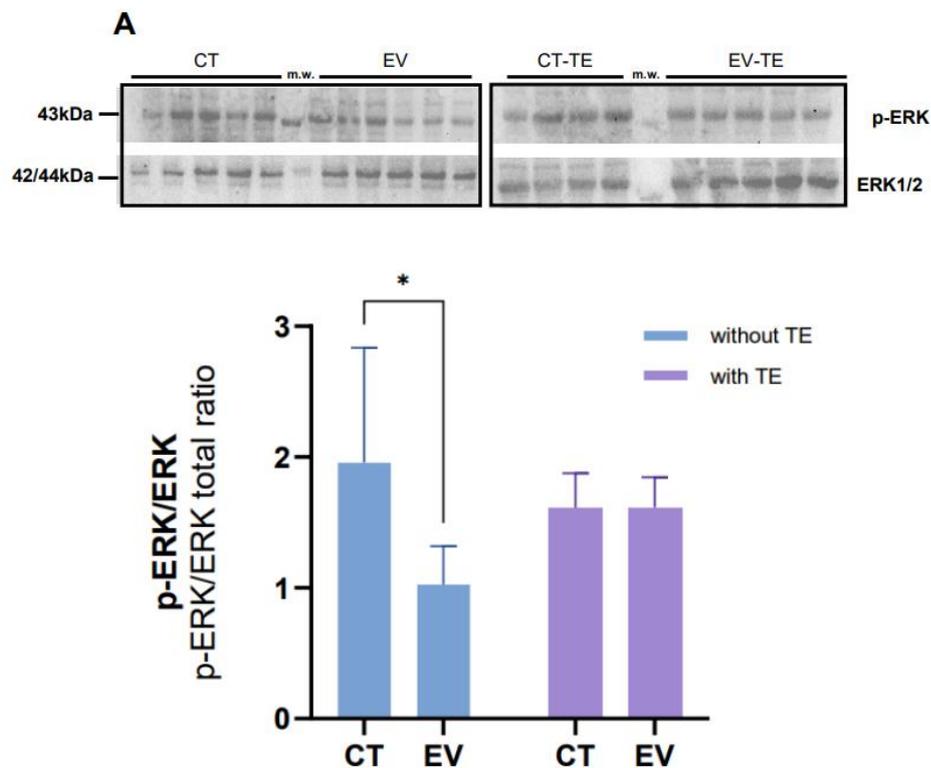


Figura 9: Níveis de p-ERK. (A) Razão entre p-ERK e ERK-total. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$. Os dados foram normalizados pelos níveis de ERK-total. Os valores representam média \pm DP num N de 3 experimentos independentes por grupo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Por outro lado, um aumento nos níveis da JNK-2 fosforilada (p-JNK) foi observado no grupo EV-TE comparado ao grupo EV (EV vs. EV-TE, $p = 0.0002$), bem como no grupo CV-TE em relação ao CT ($p = 0.0416$) (Figura 10A). (Figura 10A). Nos valores de JNK total, como vemos na figura 10C, temos um aumento no grupo CT-TE em comparação com o grupo CT ($p < 0.001$) e EV ($p < 0.01$). Na figura 10B e 10D, vemos a correlação entre os níveis de pJNK com a total. A relação mostra o aumento proeminente nos níveis de pJNK nos grupos com TE em relação ao controle (CT vs. CT-TE, $p = 0,0007$; EV vs. EV-TE, $p < 0.0001$), bem como entre os grupos que fizeram o treinamento de exaustão ($p < 0.0001$), evidenciando a ativação dessa via.

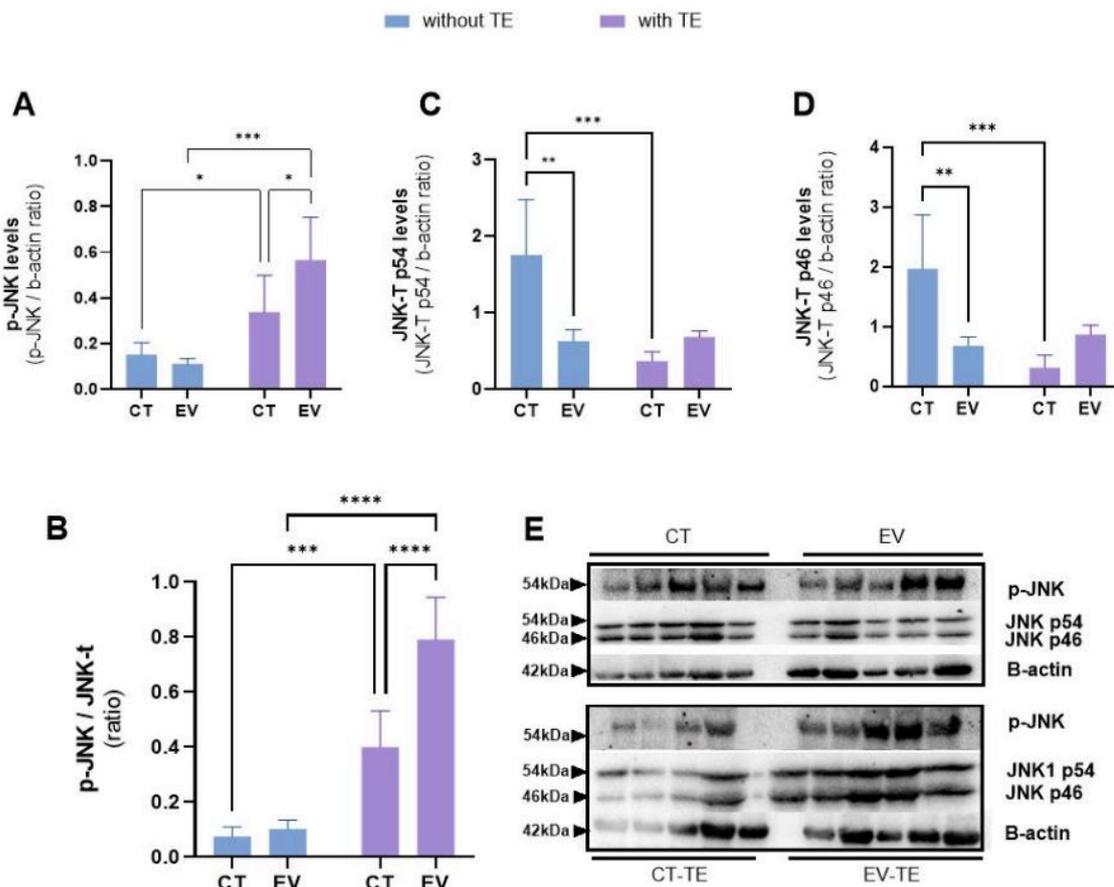


Figura 10: Níveis de p-JNK e JNK-t. (A) Níveis de p-JNK (B) Razão entre p-JNK e JNK-total (C) Níveis de JNK total. (D) Imagens de western-blotting e normalizador. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. Os dados foram normalizados pelos níveis de JNK-total. Os valores representam média \pm DP num N de 3 experimentos independentes por grupo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5.5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal motivação, comparar se a resposta antioxidante e astrocitária do córtex cerebral diante do treinamento físico aeróbico de elevado volume (EV) poderia ser maior do que a observada previamente no cerebelo (DE SOUZA, et al. 2020). Os achados, de fato, corroboraram a hipótese inicial, demonstrando que o córtex cerebral apresentou uma resiliência ao dano oxidativo induzido pelo treinamento de elevado volume e esta resposta não foi aumentada pelo teste de exaustão que simula a ultramaratona.

Vimos que o consumo de ração não teve variação significativa entre os grupos, mas o peso dos animais ao decorrer das semanas sim. Na 12^a semana, ou seja, última semana de treinamento, os animais CT tiveram um aumento no peso em relação ao grupo EV, como era o esperado. Em relação aos testes de velocidade máxima, o grupo CT obteve resultados inferiores ao grupo EV em todos os 3 testes. Como esperado, a velocidade máxima do grupo EV foi crescendo de acordo com a evolução do treinamento. No grupo CT, isso também reflete a falta de adaptação na esteira dos animais que não realizaram o EV. Outro dado que exhibe a evolução dos grupos é a pontuação de A no sistema AEY: há uma linha exponencial crescente e constante na adaptação dos ratos à esteira que vai do início da adaptação até as últimas semanas e reflete a consonância entre o perfil de corrida de cada animal entre o grupo.

O grupo CT por ser um grupo sedentário não teve índices de redução de massa corpórea. Houve variação apenas quando foi analisado a variação de peso dos grupos que realizaram o TE antes e depois do TE. O grupo EVTE, com treinamento prévio, obteve uma redução de massa corporal mais acentuada após o TE comparado ao CT-TE. A perda de massa corporal e redução de peso é uma característica comum depois de ultramaratonas (JASTRZEBSKI et al., 2015) que entra em consonância com os dados encontrados no presente estudo. A supressão dos efeitos do treinamento EV sobre os níveis totais de EROS em parte foi devida a um aumento nas atividades da SOD e CAT, que também se elevaram com o efeito aditivo do TE. O aumento na atividade da SOD e CAT foram observados no córtex cerebral de ratos submetidos a treinamento aeróbico moderado realizado por 6 semanas, 60 min/dia (CHALIMONIUK et al., 2015). A ausência de peroxidação lipídica foi também observada nesta região quando similar treinamento de 60min /dia

foi feito por apenas 4 semanas. Assim, os achados obtidos no presente estudo indicam que a capacidade antioxidante e diferencial do córtex cerebral pode ser mantida mesmo quando o treinamento é realizado por 3 meses e com duração de até 90 min/dia. Um outro aspecto que reforça esta resiliência é a de que a atividade da enzima NADPH oxidase não foi afetada, indicando que não houve produção excessiva de radicais superóxido. Os níveis de NADPH oxidase não significantes entre os grupos achados diferem do aumento observado na atividade desta enzima em ratos idosos submetidos a um treinamento físico por 8 semanas (5 x ao dia) mas com volume de apenas 50 min diários em ratos idosos (JEONG et al., 2021).

Outro achado que contribuiu foi o aumento na razão GSH/GSSG induzida pelo elevado volume, o qual indica uma melhora na capacidade redox córtex. Tal aumento foi acompanhado por uma redução nos níveis de NO. A interação recíproca entre NO e GSH tem sido relacionada como um mecanismo necessário para modular o status redox das células (BALDELLI et al., 2019). Além de seu efeito antioxidante, o GSH também pode reduzir o fluxo de NO. Evidência a favor disto, foi obtida observandose que níveis reduzidos de GSH podem desencadear um grave desequilíbrio de NO, causando morte neuronal (AQUILANO et al., 2011). Mesmo uma pequena diminuição não tóxica de GSH no cérebro causou nitração de proteínas que foi revertida pela inibição da produção de NO (AQUILANO et al., 2011b). Alguns estudos analisaram o impacto do exercício de intensidade moderada ou elevada. Esses relataram níveis aumentados de GSH no cérebro. No entanto, em uma revisão sistemática dos efeitos do treinamento aeróbio no status redox, Camiletti-Moirón et al. (2013) não encontraram uma homogeneidade na resposta de GSH, GSSG e GPx, mas uma ligeira tendência a um efeito positivo do exercício aeróbico sobre esses parâmetros. Vale ressaltar que os resultados obtidos no presente estudo são distintos dos observados no cerebelo de ratos submetidos ao mesmo tipo de treinamento de EV e ET (DE SOUZA et al., 2020). Neste estudo prévio, a razão GSH/GSSG e os níveis de NO não foram modificados. Um efeito benéfico do treinamento de EV no cortex cerebral foi também aqui evidenciado pelo aumento nos níveis de EROS e NO induzidos pelo TE no grupo controle mas não no grupo EV-TE. Neste caso, o aumento na razão GSH/GSSG não foi capaz de neutralizar o estresse oxidativo, indicando que mecanismos adicionais de reposição antioxidante foram ativados pelo treinamento.

Sabe-se que a inflamação desempenha um papel importante durante as respostas de defesa do organismo a diferentes tipos de estímulos facilitando a regeneração tecidual. No cérebro, a resposta inflamatória moderada pode ser benéfica e vital em algumas circunstâncias, mas também deletéria em doenças cerebrais crônicas. O exercício de longa duração em intensidade baixa a moderada tem sido documentado como um importante modulador da neuroinflamação e ativação glial, induzindo respostas adaptativas (Mee-Inta et al., 2019). A transcrição gênica da IL-1b também pode ser estimulada pelo estresse oxidativo (Haddad e Harb, 2005). No cérebro saudável, os níveis do pró-IL-1b e a IL-1b ativa estão baixos. A IL-1B pode estimular uma variedade de vias de sinalização, incluindo aquelas envolvidas na plasticidade sináptica (Hewett et al., 2012). Por outro lado, os níveis de IL-1b no cérebro podem ser aumentados por danos locais e/ou inflamação periférica (PITOSSO et al., 1997; LAYE et al., 2000; HEWETT, 2012).

Os dados do presente estudo mostram que aumento dos níveis de IL1b no cortex cerebral foram induzidos apenas no grupo EV sendo revertidos no grupo EV-TE. Estes achados mostram que os níveis desta IL não estão diretamente relacionados a uma redução do estado redox e aumentada produção de EROS. Os resultados aqui observados diferem também dos relatados no cerebelo onde apenas o TE aumentou níveis de IL-1b em todos os grupos (DE SOUZA et al., 2020). Por outro lado, se assemelham na resposta do grupo EV-TE, onde foi vista uma redução em seus níveis. Embora o mecanismo envolvido neste efeito não foi estudado no presente trabalho, isto indica que o estímulo prévio do treinamento de EV pode induzir respostas similares a metaplasticidade e após exposição ao TE.

A ERK1/2 é uma quinase mitogênica que secreta sinais facilitadores para a expressão de GFAP (BRENNER; MESSING, 2021; LI et al., 2020). Tanto ela como a JNK e a p38 estão envolvidas com a via de ativação da MAPK, envolvidas com diferenciação, proliferação e sobrevivência (LI et al., 2020). Ativação da via de sinalização da ERK1/2 no músculo vem sendo descrita após alguns tipos de treinamento físico, como indicativas de um estado de reatividade. Por outro lado, em ratos com hipoperfusão cerebral crônica, que é responsável por aumentar os níveis proteicos da pERK1/2, o treinamento físico aeróbico de baixo volume (20 min) por 2 meses reduziu os níveis desta molécula bem como da p-JNK, o que configurou um mecanismo de neuroproteção (CAO et al., 2022). Os nossos achados evidenciaram que o treinamento EV provocou uma redução nos níveis de

fosforilação da ERK1/2, os quais ocorreram concomitantemente à preservação dos níveis da p-JNK e JNK-t.

Estudos *in vitro* utilizando culturas de astrócitos mostraram que astrócitos tipo 1 expressam níveis comparáveis as duas isoformas de JNK1/2 enquanto o astrócitos tipo 2 e oligodendrócitos predominantemente expressam JNK-1 (ZHANG et al., 1997). Estímulos inflamatórios como TNF-alfa, estimulam predominantemente a JNK-1 (ZHANG et al., 1997). As evidências aqui obtidas relativas aos níveis de p-JNK foram analisadas em relação à isoforma p-JNK-1 o qual é predominante expresso em astrócitos reativos a estímulos inflamatórios. Assim, o aumento na razão pJNK/total JNK induzido pelo TE tanto no grupo controle como no de EV, podem indicar mecanismos de reatividade distintas e uma potencial resposta similar à metaplasticidade, onde a inversão dos efeitos do estímulo prévio ocorre.

Vale ressaltar que estas alterações na expressão da JNK total ou pJNK ocorreram quando os níveis de todas as isoformas de GFAP foram similares ao controle. No grupo CT-TE, ela coincide com um aumento nos níveis de NO e EROS. Por outro lado, no grupo EV-TE, ocorre na ausência do estresse oxidativo aqui analisado. Futuros estudos precisam ser feitos para elucidar estas questões.

As isoformas envolvidas com o processo de enrijecimento dos filamentos intermediários (39kDa e 45kDa) (HOL & PEKONY, 2015) foram encontradas elevadas no grupo de EV em relação ao CT. Quando comparadas ao EV-TE, percebemos um retorno ao controle que é característica de um perfil adaptativo na resposta do GFAP ao dano. No estudo anteriormente realizado pelo grupo, a partir de análises no cerebelo, vimos que no TE, mesmo com o treinamento prévio de elevado volume (EV-TE), houve uma elevação na isoforma de 39KDA (DE SOUZA, et al. 2020). Ou seja, as células cursam com um fenótipo onde há enrijecimento do citoesqueleto, podendo impedir sua proliferação e funcionalidade (HOL & PEKONY, 2015).

Essas isoformas que exibiram uma redução no EV-TE em comparação com o EV estão envolvidas em uma redução na astrogliose, retornando aos níveis do controle, indicando um processo de adaptação a partir do exercício. Mesmo que danoso, as células astrocitárias corticais dos indivíduos que tiveram um treinamento prévio de elevado volume tiveram uma maior resistência ao processo oxidativo e inflamatório relativo ao TE. As isoformas de 50kDa e 55kDa tem um ponto isoelétrico que é favorável para pH ácidos, aumentando sua expressão em fases proliferativas do ciclo celular. O aumento no perfil de expressão de isoformas com 50kDa e

55kDa) envolve processos de proliferação e ativação da resposta astrocitária frente ao dano (HOL & PEKNY, 2015).

É visto que os resultados das análises bioquímicas coadunam com o perfil de expressão proteica do GFAP quando vemos os retornos aos níveis basais no TE. Sabendo que a célula astrocitária é responsável pelo armazenamento e liberação de enzimas antioxidantes, como SOD e CAT, percebemos a importância dos variados fenótipos astrocitários dentro de um processo de injúria. Além disso, os astrócitos são as maiores reservas de glutathione (GSH) do cérebro, o que corrobora com o aumento dessa razão na sua ativação. A plasticidade relacionada encontrada ocorre, principalmente, no grupo EV-TE. O estudo mostra uma visão variada sobre as respostas antioxidantes e a função das células gliais do córtex cerebral a partir do treinamento de alto volume. Por fim, o córtex cerebral apresenta resiliência ao dano oxidativo induzido pelo treinamento de alto volume. No entanto, tais efeitos não são intensificados pela prova de ultra resistência. A falta de reatividade antioxidante ou astrogliar adicional após TE indica respostas plásticas adaptativas relacionadas a vias de sinalização celular distintas.

5.6 REFERÊNCIAS

AQUILANO, Katia et al. Nitric oxide is the primary mediator of cytotoxicity induced by GSH depletion in neuronal cells. *Journal of cell Science*, v. 124, n. 7, p. 1043-1054, 2011.

BALDELLI, Sara et al. Glutathione and nitric oxide: key team players in use and disuse of skeletal muscle. *Nutrients*, v. 11, n. 10, p. 2318, 2019.

CAMILETTI-MOIRÓN, D. et al. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, v. 23, n. 4, p. e202-e212, 2013.

CHALIMONIUK, M. et al. Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats. *J Physiol Pharmacol*, v. 66, n. 4, p. 539-547, 2015.

DE SOUZA, R. F. et al. Ultra-Endurance Associated With Moderate Exercise in Rats Induces Cerebellar Oxidative Stress and Impairs Reactive GFAP Isoform Profile. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 13, 2 set. 2020.

FREUND, W et al. Substantial and reversible brain gray matter reduction but no acute brain lesions in ultramarathon runners: experience from the TransEurope-FootRace Project. *BMC Medicine*, v. 10, p. 170, 2012.

GREEN, L.C. et al. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids Automated NO and NO. *Analysis* 138, 1982

JASTRZĘBSKI, Z. et al. Damage to liver and skeletal muscles in marathon runners during a 100 km run with regard to age and running speed. *J. Hum. Kinet.* 45, 93–102, 2015
74 HISSIN, P.J.; HILF, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* v. 74, 214–326, 1976

HOL, E. M.; PEKNY, M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology Elsevier*, 2015.
LI, D. et al. Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. *GLIA*, 2020.

MISRA, H., FRIDOVICH, I. The Role of Superoxide Anion in the Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase * Autoxidation of 247, 1972
NIJMEH, J., et al. 2018. Role of ROS in ischemia-induced lung angiogenesis, 21224, p. 535–541.

PITOSSO, F. et al. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *Journal of neuroscience research*, v. 48, n. 4, p. 287-298, 1997.

RÍOS-KRISTJÁNSSON, J. G. et al. A three-criteria performance score for rats exercising on a running treadmill. *Plos one*, v. 14, n. 7, p. e0219167, 2019.

SINGIN, R. O. DUZ, S. KIRAZ, M. Cortical and subcortical brain volume alterations following endurance running at 38.6 km and 119.2 km in male athletes. *Medical*

Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, v. 27, 2021.

O'KEEFE, Evan L. et al. Training for longevity: the reverse J-curve for exercise. Missouri medicine, v. 117, n. 4, p. 355, 2020.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. Frontiers in Aging Neuroscience, 2010.

WOOD, K. N. et al. Impact of Long-Term Endurance Training vs. Guideline-Based Physical Activity on Brain Structure in Healthy Aging. Front. Aging Neurosci, v. 8:, p. 155, 2016

6 ANEXOS

ANEXO 1. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE.

ANEXO 2. Premiação – MENÇÃO HONROSA - Apresentação em pôster – Simpósio Internacional de Neuroquímica e Fisiopatologia da célula Glial 2022 (UFBA).

ANEXO 3. Premiação – 1º LUGAR – MESTRADO - Apresentação em Pôster – Simpósio Internacional de Neuroquímica e Fisiopatologia da célula Glial 2023 (UFBA)

ANEXO 4. Premiação – 1º LUGAR – MESTRADO - Apresentação Oral – Simpósio Internacional de Neuroquímica e Fisiopatologia da célula Glial 2023 (UFBA)

ANEXO 5. Participação em artigos a serem submetidos.

ANEXO 6. Participação em artigos publicados 2022-2023.

ANEXO 1. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
(1/2)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 21 de setembro de 2023

Ofício nº 72/23

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof. **Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia/CB
Processo nº0048/2023

Certificamos que a proposta intitulada “**Pode o exercício aeróbico de elevado volume induzir remodelagem fenotípica e vias de sinalização diferenciais em astrócitos do cerebelo e córtex cerebral de ratos? implicações para a neuroplasticidade**”. Registrado como **0048/2023** sob a Responsabilidade do **Prof. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa** Que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 29/08/2023

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/08/2023 até 25/07/2025
Espécie/linhagem/raça	Rato isogênico /wistar
Nº de animais	48 animais
Peso/idade	60 g / 30 dias
Sexo	Machos (48)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva
-Presidente CEUA/UFPE
SI&PE 2345691

ANEXO 1. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
(2/2)



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 cea@ufpe.br

PARECER

Certificamos que a proposta intitulada “**Estresse oxidativo cerebelar em ratos após corridas de elevados volumes e uma dieta rica em licopeno**”, registrada com o nº 0035/2017 do processo, sob a responsabilidade da **Prof. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em reunião no dia 27/10/2020.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Novembro de 2020 a novembro de 2021
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogenico /Wistar
Nº de animais	30
Peso/Idade	150g / 60 dias
Sexo	Macho (30)
Origem: Biotério de Criação	Bioterio do Departamento de Fisiologia da UFPE
Destino: Biotério de Experimentação	Bioterio do Departamento de Fisiologia da UFPE

Atenciosamente

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

ANEXO 2. Premiação – MENÇÃO HONROSA - Apresentação em pôster – Simpósio Internacional de Neuroquímica e Fisiopatologia da célula Glial 2022 (UFBA).



ANEXO 3. Premiação - Apresentação em Pôster – Simpósio Internacional de Neuroquímica e Fisiopatologia da célula Glial 2023 (UFBA)



ANEXO 4. Premiação – Apresentação Oral – Simpósio Internacional de Neuroquímica e Fisiopatologia da célula Glial 2023 (UFBA)

