



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS- FISILOGIA

TESE DE DOUTORADO

**EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE A ATIVIDADE DE SECRETASES E O
PERFIL DE EXOSSOMOS CIRCULANTES: MODULAÇÃO PELO EXERCÍCIO
FÍSICO**

Karine Bertoldi

Porto Alegre, 2016

Karine Bertoldi

**EFEITO DO ENVELHECIMENTO SOBRE A ATIVIDADE DE SECRETASES E O
PERFIL DE EXOSSOMOS CIRCULANTES: MODULAÇÃO PELO EXERCÍCIO
FÍSICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Fisiologia.

Orientadora: Dr^a Ionara Rodrigues Siqueira

Porto Alegre, 2016.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meu pai Alfide e minha mãe Adelaide, pela educação e pelo esforço para me proporcionar um estudo de qualidade. À minha irmã Maqueli pelo apoio e incentivo e por vários anos de parceria e alegrias. Obrigada por acreditarem na minha capacidade, amo vocês.

Ao meu namorado Gustavo, pelos vários anos de companheirismo, estudo, alegrias e conquistas. Os medos e inseguranças tornam-se menores quando estamos acompanhados de pessoas que amamos e que nos incentivam em nossos desafios.

À minha orientadora, Profa. Ionara Rodrigues Siqueira por uma década de parceria, ensinamentos e confiança. Obrigada por me apresentar ao mundo da pesquisa e me fazer descobrir que com boa vontade e muito estudo somos muito mais capazes do que imaginamos. Agradeço pela dedicação e pelo exemplo de pesquisadora.

Aos meus colegas de laboratório, desde os mais antigos aos mais novos. Durante a minha longa trajetória no laboratório, tanto durante a graduação quanto na pós-graduação, muitas pessoas passaram pela minha vida e não foram apenas colegas de laboratório, mas sim grandes amigos que moram no meu coração. Obrigada a todos por dividirem as decepções e também as muitas alegrias durante todos esses anos sempre com bom humor e otimismo.

Ao Professor da Faculdade de Odontologia da UFRGS, Marcelo Lamers e suas alunas Lisiane e Grazieli por disponibilizar o seu laboratório para a realização de experimentos, pelos ensinamentos e pela paciência. Obrigada pelo ótimo acolhimento e por toda ajuda que recebi.

À Professora Irene Cledes Kulkamp Guerreiro da Faculdade de Farmácia da UFRGS e seu aluno de doutorado Samuel pela parceria e ajuda na caracterização dos exossomos.

Ao PPG Fisiologia, ao CNPq e à UFRGS pela oportunidade de realizar o doutorado em uma Programa de Pós-Graduação com tanta tradição e pelo suporte técnico e financeiro recebido.

*“...guardar dias pro futuro
É sempre a grande tolice
O juro é sempre a velhice
E de que adianta este juro
Se ao índio mais queixo duro
O tempo amansa no assédio
Gastar é o melhor remédio
No repecho e na descida
Porque na conta da vida
Não adianta saldo médio!”*

Do Tempo, Jayme Caetano Braun

RESUMO

As vias amiloidogênica e não-amiloidogênica, representadas pelas enzimas secretases como a enzima clivadora do sítio beta da APP (BACE) e a enzima conversora do fator de necrose tumoral-alfa (TACE) respectivamente, são responsáveis pela clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Alterações no processamento da APP associadas ao acúmulo do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) parecem estar relacionadas aos déficits cognitivos observados na doença de Alzheimer (DA), no entanto, estudos avaliando a maquinaria de processamento da APP durante o envelhecimento fisiológico são raros. O $A\beta$ é formado através da clivagem da proteína precursora amiloide (APP) pela enzima BACE. Por outro lado, a APP pode ser clivada por secretases como a TACE gerando $APP\alpha$, o qual é considerado neuroprotetor. Alguns estudos têm sugerido um envolvimento de vesículas denominadas exossomos no transporte de proteínas como o peptídeo $A\beta$ além de um papel dos exossomos durante o estresse oxidativo e no processo de envelhecimento. No entanto, estudos avaliando a relação entre exossomos e marcadores oxidativos no envelhecimento ainda não foram realizados. Além disso, apesar de diversas evidências demonstrarem os efeitos benéficos do exercício físico, os efeitos exercidos sobre a modulação da atividade das secretases, especificamente TACE e BACE, e sobre o perfil dos exossomos durante o envelhecimento fisiológico têm sido pouco investigados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do exercício físico sobre a atividade das secretases e sobre o perfil de exossomos circulantes em ratos durante o envelhecimento. Ratos Wistar de 3, 21 e 26 meses de idade foram divididos em sedentários e exercitados, o protocolo de exercício consistiu em 20 min/ dia durante 14 dias e após a última sessão de exercício todos os animais foram submetidos ao teste da esQUIVA inibitória. As estruturas cerebrais e o sangue troncular foram coletados 1h (período da tarde) e 18 h (período da manhã) após a última sessão de exercício com o objetivo de avaliar os efeitos transitórios e tardios do protocolo de exercício. O hipocampo e o córtex pré-frontal foram dissecados e utilizados para quantificar o conteúdo de APP e avaliar a atividade das enzimas TACE e BACE. Os exossomos foram isolados do soro e utilizados para quantificar CD63, atividade da acetilcolinesterase (AChE), conteúdo de espécies reativas, atividade da superóxido dismutase (SOD) e conteúdo de $A\beta$. Ratos envelhecidos demonstraram um prejuízo na memória aversiva assim como uma redução na atividade da TACE comparada aos animais adultos jovens. A atividade cortical da BACE aumentou no período da tarde nos animais de 26 meses de idade, no entanto, permaneceu inalterada assim como o conteúdo de APP no hipocampo de todos os grupos. Além disso, uma diminuição na razão TACE/BACE foi observada em animais envelhecidos. Adicionalmente, foram observados níveis diminuídos de CD63 e um aumento na atividade da AChE em exossomos circulantes de animais de 21 e 26 meses de idade. Altos níveis de espécies reativas foram detectados em exossomos de animais envelhecidos. O exercício físico foi capaz de melhorar o desempenho dos animais de todas as idades no teste da esQUIVA inibitória. Por outro lado, a atividade das secretases não foi alterada pelo protocolo de exercício físico utilizado. Em relação aos exossomos, o exercício físico foi capaz de aumentar os níveis de CD63 em todas as idades avaliadas. Foram observados níveis reduzidos de espécies reativas em exossomos de animais exercitados de todas as idades além de uma redução na

atividade da AChE em exossomos de animais envelhecidos exercitados. Nossos resultados sugerem uma relação entre redução da atividade da TACE e declínio na memória aversiva em animais envelhecidos. Além disso, um desequilíbrio entre as vias amiloidogênica e não-amiloidogênica pode contribuir com a suscetibilidade das regiões corticais e hipocampais às doenças neurodegenerativas. Podemos inferir que o envelhecimento é capaz de alterar o perfil dos exossomos, assim como níveis aumentados de espécies reativas em exossomos circulantes de ratos de 21 e 26 meses podem desempenhar um importante papel no estado oxidativo relacionado ao envelhecimento. Adicionalmente, é possível sugerir que a redução nos níveis de espécies reativas em exossomos circulantes pode contribuir com os efeitos protetores do exercício físico durante o processo de envelhecimento.

Palavras chave: hipocampo; córtex pré-frontal; TACE; BACE; exossomos; SOD; espécies reativas

ABSTRACT

The amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways, represented by secretases named β -site APP cleaving enzyme (BACE) and tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE), respectively, are responsible for amyloid protein precursor (APP) processing. APP cleavage modifications leading to increased β -amyloid ($A\beta$) peptide levels seem to be related to cognitive decline observed in Alzheimer disease (AD), however, works evaluating the APP processing machinery in the normal aging process are rarely studied. The $A\beta$ is formed through APP cleavage by BACE enzyme, named amyloidogenic pathway. On the other hand, APP can be cleaved by a non-amyloidogenic pathway through secretase enzymes such as TACE producing $APP\alpha$, which is a neuroprotective product. Some evidences suggested that extracellular vesicles named exosomes could carry proteins including the $A\beta$ peptide between different cells. Yet, exosomes appear to be linked to oxidative stress and aging process. However, studies evaluating the relationship between exosomes and oxidative stress marks in the aging were not yet performed. The beneficial exercise impact in the aging process are widely described, nevertheless, its effects on secretase activities, specifically BACE and TACE, and exosome profile during normal aging remains understood. Therefore, the aim of this study was to evaluate the exercise effects on secretase activities and circulating exosomes profile in the aging process. Wistar rats (3-, 21- and 26-month-old) were divided into sedentary and exercised groups; the exercise protocol consisted in a daily moderate treadmill exercise (20 min each day during 2 weeks). After the last exercise sessions, all animals were subjected to inhibitory avoidance task. To identify transitory and delayed exercise effects, specifically 1 and 18 hours after the last exercise training session, hippocampi and prefrontal cortices as well as blood were obtained at different times of day, respectively, in the afternoon and early morning. The brain areas were used to quantify the APP content and BACE and TACE activities. The circulating exosomes were isolated from serum and used to quantify CD63, reactive species and $A\beta$ content, besides AChE and superoxide dismutase (SOD) activities. Aged rats exhibited impaired aversive memory performance and reduced TACE activity compared to young adult rats. TACE activity also was reduced in hippocampus of 26-month-old rats. Cortical BACE activity was higher in the afternoon in the oldest-old group (26-month-old rats), while hippocampal BACE activity and APP content were unchanged in all groups. Additionally, decreased levels of CD63 and increased AChE activity were observed in circulating exosomes of 21 and 26-month-old rats. It was demonstrated that aged animals present high free radical levels. The step-down latency in inhibitory avoidance was increased by exercise at all tested ages. Exercise reduced peripheral exosomal reactive species content in all tested ages besides to reduce AChE activity in exercised aged rats. Our results suggest a relationship between decreased cortical TACE activity and aging-related aversive memory decline. An imbalance between BACE and TACE activities, indexes of amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways, was found in both tested brain areas suggesting a higher vulnerability to neurodegenerative disorders induced by aging. Moreover, it is possible suggest that the normal aging process can alter circulating exosomal profile; as well as increased reactive species levels found in peripheral exosomes of aged rats can play a crucial role in the oxidative status

associated to aging. Additionally, we can suppose that reduced reactive species levels in circulating exosomes can contribute to beneficial exercise effects in the aging process.

Key words: hippocampus; prefrontal cortex; TACE; BACE; exosomes; SOD, reactive species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo da proteína precursora amiloide (APP) realizado pelas vias amiloidogênica (β -secretase, BACE) e não-amiloidogênica (α -secretase) ..	21
Figura 2. Biogênese dos exossomos a partir da membrana dos corpos multivesiculares e secreção para o espaço extracelular.....	24
Figura 3. Composição dos exossomos proteínas específicas de membrana e intracelulares.....	25
Figura 4. Comunicação célula-célula realizada pelos exossomos e transferência parácrina do seu conteúdo.....	26
Figura 5. Esquema representativo da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx.....	30
Figura 6. Desenho esquemático dos grupos experimentais (12 grupos)	44
Figura 7. Linha do tempo do protocolo de exercício físico e do teste da esquiiva inibitória.....	44
Figura 8. Esteira ergométrica adaptada para ratos.....	45
Figura 9. Aparato da esquiiva inibitória.....	47

Artigo I

Figure 1. Schematic diagram showing experiment design used in this study.....	60
Figure 2. Effects of aging and treadmill exercise on step-down latency in the inhibitory avoidance test.....	60
Figure 3. Effects of aging and treadmill exercise on the hippocampal TACE activity in both tested time points; (Panel A) 1 hour groups, (Panel B) 18 hours groups.....	61
Figure 4. Effects of aging and treadmill exercise on the hippocampal BACE activity in both tested time points; (Panel A) 1 hour groups, (Panel B) 18 hours groups.....	61
Figure 5. Effects of aging and treadmill exercise on the cortical TACE activity in both tested time points; (Panel A) 1 hour groups, (Panel B) 18 hours groups.....	61

Figure 6. Effects of aging and treadmill exercise on the cortical BACE activity in both tested time points; (Panel A) 1 hour groups, (Panel B) 18 hours groups.....62

Figure 7. Effects of aging and treadmill exercise on the hippocampal TACE/BACE ratio in both tested time points; (Panel A) 1 hour groups, (Panel B) 18 hours groups.....62

Figure 8. Effects of aging and treadmill exercise on the cortical TACE activity in both tested time points; (Panel A) 1 hour groups, (Panel B) 18 hours groups.....63

Artigo II

Figure 1. Timeline of exercise protocol and sample collection.....91

Figure 2. Aging and exercise effects on CD63 levels in circulating exosomes from 3-, 21- and 26- month-old Wistar rats. (A) 1 hour groups; (B) 18 hours groups.....92

Figure 3. Aging and exercise effects on AChE activity in circulating exosomes from 3-, 21- and 26-month-old Wistar rats. (A) 1 hour groups; (B) 18 hours groups.....93

Figure 4. Aging and exercise effects on reactive species levels in circulating exosomes from 3-, 21- and 26-month-old Wistar rats. (A) 1 hour groups; (B) 18 hours groups.....94

Figure 5. Aging and exercise effects on SOD activity in circulating exosomes from 3-, 21- and 26- month-old Wistar rats. (A) 1 hour groups; (B) 18 hours groups.....95

Figure 6. Aging and exercise effects on A β 1-42 levels in circulating exosomes from 3-, 21- and 26- month-old Wistar rats. (A) 1 hour groups; (B) 18 hours groups.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de exercício físico diário moderado em esteira ergométrica adaptada para ratos.....	46
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aβ	Peptídeo β -amiloide
AChE	Enzima acetilcolinesterase
iAChE	Inibidor da enzima acetilcolinesterase
APP	Proteína precursora amiloide
APP/PS1	Transgênico com dupla mutação nos genes da APP e PS1
ADAM 9	Proteína com domínios metalopeptidase e tipo-desintegrina 9
ADAM 10	Proteína com domínios metalopeptidase e tipo-desintegrina 10
ADAM 17	Proteína com domínios metalopeptidase e tipo-desintegrina 17
BACE	Enzima clivadora do sítio β da APP
BHE	Barreira hemato-encefálica
CAT	Enzima catalase
DA	Doença de Alzheimer
DCFH-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
EXE	Exercitado
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato deidrogenase
GPx	Enzima glutathiona peroxidase
IGF-1	Fator de crescimento endotelial vascular 1
LCR	Líquido cefalorraquidiano
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
RFU	Unidade relativa de fluorescência
SED	Sedentário
SOD	Enzima superóxido dismutase
SOD1	Superóxido dismutase-cobre e zinco
SOD2	Superóxido dismutase-manganês

SOD3	Superóxido dismutase extracelular
SNC	Sistema nervoso central
TACE	Enzima conversora do fator de necrose tumoral-alfa
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
VO₂max	Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LIST DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Envelhecimento.....	17
1.1.1. Envelhecimento e memória.....	18
1.2. Proteína precursora amiloide (APP) e secretases.....	20
1.3. Exossomos.....	23
1.4. Estresse oxidativo.....	28
1.5. Exercício físico no processo de envelhecimento.....	33
2. HIPÓTESES.....	38
3. OBJETIVO.....	40
3.1. Objetivo Geral.....	41
3.2. Objetivos Específicos.....	41
4. ABORDAGEM METODOLÓGICA.....	42
4.1. Animais.....	43
4.2. Desenho Experimental.....	43
4.3. Protocolo de Exercício Físico.....	45
4.4. Teste da Esquiva Inibitória.....	47
4.5. Preparo das Amostras.....	48
4.6. Quantificação da APP e atividade das secretases em hipocampo e córtex pré-frontal.....	49
4.6.1. Western blot.....	49
4.6.2. Atividade da enzima β -secretase (BACE).....	50
4.6.3. Atividade da enzima α -secretase (TACE).....	50
4.7. Isolamento e perfil de exossomos circulantes.....	51
4.7.1. Isolamento de exossomos circulantes.....	51
4.7.2. Níveis de CD63 em exossomos.....	51
4.7.3. Níveis de A β 1-42 em exossomos.....	52
4.7.4. Níveis de espécies reativas em exossomos.....	52
4.7.5. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em exossomos.....	53
4.7.6. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em exossomos.....	53
4.8. Quantificação de proteínas totais.....	54
4.9. Análise Estatística.....	54
4.10. Considerações Éticas.....	54
5. RESULTADOS.....	56
5.1. Artigo I.....	57
5.2. Artigo II.....	66
6. DISCUSSÃO.....	97
7. CONCLUSÕES.....	112
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
ANEXO I.....	127
ANEXO II.....	128

1. Introdução

1.1. Envelhecimento

Nas últimas décadas, um aumento significativo da expectativa de vida tem sido observado como consequência dos avanços na área da saúde, acesso ao saneamento básico e desenvolvimento de novas tecnologias (Lima-Costa e Veras, 2003; de Silva e Boemer, 2009). Segundo o relatório da Organização das Nações Unidas divulgado em 2011, até 2020 o número de pessoas com 65 anos ou mais irão superar o número de crianças menores de 5 anos (WHO, 2011). No Brasil, os dados mais atualizados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística indicam que as pessoas com idade igual ou superior aos 60 anos correspondem a 11,8% da população total. Ainda, em relação ao Rio Grande do Sul, estado brasileiro com o maior número de indivíduos acima de 60 anos, 13,6% da população total é considerada idosa (Censo 2010, IBGE).

O aumento da expectativa de vida é um gerador de desafios a diversas áreas do conhecimento, portanto, o processo de envelhecimento necessita ser estudado adequadamente. O envelhecimento é um fenômeno complexo caracterizado pelo declínio progressivo das funções fisiológicas e redução na capacidade de se adaptar ao meio ambiente (Deleidi et al., 2015; Miniciullo et al., 2015). Este fenômeno biológico é resultado da interação entre fatores ambientais e genéticos, assim, tanto o estilo de vida quanto a carga genética são aspectos determinantes na longevidade de cada indivíduo (Motta et al. 2007, Nicita-Mauro et al. 2008). Além disso, a perda da homeostase em diferentes sistemas e órgãos está associada ao aumento da vulnerabilidade ao desenvolvimento de diversas patologias. Cabe destacar que o rápido crescimento demográfico no número de idosos tem como consequência um importante

aumento no número de indivíduos com declínio cognitivo (Ballesteros et al., 2015; Hurd et al., 2013). Ainda, fatores ambientais, como o estilo de vida sedentário, observado frequentemente na sociedade moderna, contribuem diretamente para o aumento da incidência de patologias associadas à idade incluindo a demência. É importante ressaltar que a idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA) e a Doença de Parkinson (DP) as quais levam à incapacidade de realização de atividades diárias e geram altos custos ao sistema de saúde (Ballard et al., 2011; Findley, 2007; Martinez-Martín et al., 2015). Diversas alterações podem ser observadas tanto no processo de envelhecimento quanto na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas como prejuízos na função mitocondrial, estresse oxidativo, acúmulo anormal de proteínas, alterações no metabolismo do ferro além de excitotoxicidade e inflamação (Bence et al., 2001; Halliwell 2001; Jenner 2003; Zeevalk et al. 2005).

1.1.1 Envelhecimento e memória

Especificamente no sistema nervoso central (SNC), o processo de envelhecimento é caracterizado por modificações estruturais além de prejuízo na capacidade de adaptação deste sistema às alterações ambientais, resultando em um declínio das habilidades sensório-motoras e cognitivas (Bishop et al., 2010; Goh, 2011). Diversas regiões cerebrais são afetadas pelo avanço da idade, no entanto, o hipocampo e o córtex pré-frontal são considerados estruturas particularmente vulneráveis (Burke & Barnes, 2006; Erickson & Barnes, 2003). Neste contexto, o desempenho em testes comportamentais que envolvem ambas

as regiões encefálicas geralmente está prejudicado em animais envelhecidos (Burke & Barnes, 2006). Entre os diferentes testes comportamentais que avaliam a memória, aqueles que associam lugares ou contextos à punição como o teste da esQUIVA INIBITÓRIA são amplamente utilizados (Benetti et al., 2015; Fernandes et al., 2013; McReynolds et al., 2014). Regiões cerebrais como o hipocampo, a amígdala basolateral e o córtex pré-frontal estão associadas ao processo de consolidação da memória observado durante o teste da esQUIVA INIBITÓRIA (Benetti et al., 2015). Em acordo, Yang & Liang (2014) sugerem uma interação entre o hipocampo dorsal e o córtex pré-frontal na consolidação da memória demonstrando que a plasticidade cerebral envolvida nesse processo necessita da interação de múltiplas regiões cerebrais.

Embora o declínio cognitivo associado à idade seja amplamente discutido, os mecanismos responsáveis ainda não estão totalmente elucidados. Neste contexto, modificações características do SNC durante o envelhecimento como redução na capacidade de regeneração e prejuízo das funções sinápticas parecem contribuir para o declínio das funções cognitivas (Morrison & Baxter 2012; Rando 2006). Além disso, estudos já demonstraram que fatores como aumento do estresse oxidativo, morte neuronal e acúmulo anormal de proteínas podem impactar de forma negativa em funções cognitivas como habilidade de aprendizado, retenção da memória e funções executivas durante o envelhecimento (Dmitrieva et al., 2007; Glisky, 2007; Yankner & Loerch, 2008). Estudos têm demonstrado que a deposição do peptídeo β -amiloide está relacionada não só ao desenvolvimento da doença de Alzheimer, mas também ao processo de envelhecimento fisiológico (McLean, 1999; Price, 1993; Walsh et al., 2002). Os peptídeos $A\beta$ são conhecidos por sua neurotoxicidade e têm sido

amplamente investigados (Chow et al., 2009; Hartley et al., 1999). Diversos estudos demonstram que o acúmulo do A β 42 e consequente formação de placas amiloides são centrais na fisiopatologia da DA e ainda, que sua extensa deposição está relacionada aos níveis de dano neuronal, prejuízo cognitivo e perda de memória (Ballard et al., 2011; Walsh et al., 2002; Yun et al., 2006). No entanto, resultados controversos já foram descritos em relação aos efeitos do A β sobre a cognição, e principalmente em relação à memória. Trabalhos realizados por diferentes grupos de pesquisa demonstraram um efeito ambíguo do A β o qual pode levar tanto à melhora quanto ao déficit do desempenho cognitivo (Lesné et al., 2006; Morley & Farr, 2014; Mura et al., 2012; Oh et al., 2011). Por outro lado, estudos de imagem in vivo não observaram nenhuma correlação entre desempenho cognitivo e deposição cerebral de peptídeo amiloide (Aizenstein et al., 2008). Desta forma, embora a hipótese amiloide seja amplamente aceita como principal responsável pela fisiopatologia da DA, é importante destacar o envolvimento de outros mecanismos associados aos déficits cognitivos característicos do processo de envelhecimento fisiológico.

1.2. Proteína precursora amiloide (APP) e secretases

A proteína precursora amiloide (APP) é uma proteína integral de membrana tipo I composta por uma grande região extracelular, uma hélice transmembrana e uma pequena cauda citoplasmática (Bossy-Wetzel, 2004). A APP pode ser encontrada no SNC, expressa predominantemente em neurônios, no entanto, também pode ser encontrada em alguns tecidos periféricos. A clivagem da APP pode ser realizada por duas vias, amiloidogênica e não-

amiloidogênica sendo que ambas geram produtos finais distintos, Figura 1 (Nunan & Small, 2000; Sastre et al., 2008).

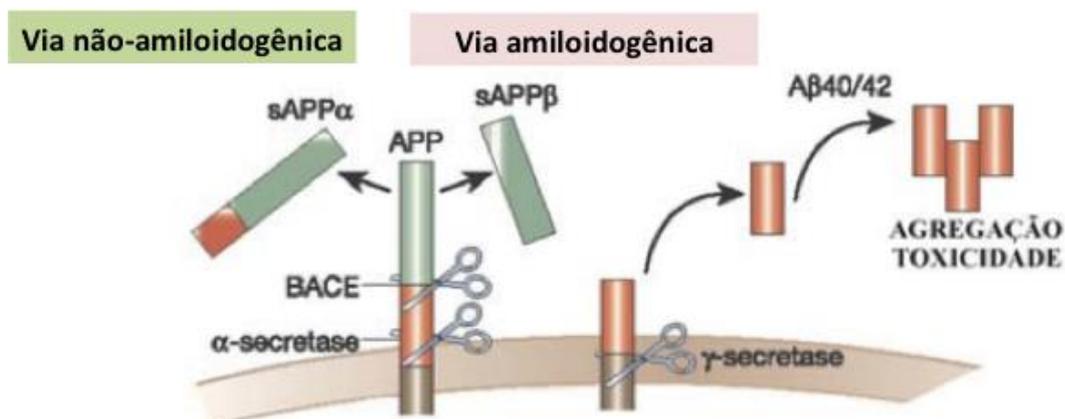


Figura 1. Metabolismo da proteína precursora amiloide (APP) realizado pelas vias amiloidogênica (β -secretase, BACE) e não-amiloidogênica (α -secretase) (adaptado de Sastre et al., 2008).

A via amiloidogênica é representada pela clivagem sequencial da APP por duas enzimas secretases, β -secretase seguida da γ -secretase originando o peptídeo A β (Chow et al., 2010, Takahashi et al., 2010). A enzima β -secretase, denominada enzima clivadora do sítio β da APP (BACE), é uma aspartil protease altamente expressa em neurônios. Existem dois tipos de β -secretases identificadas a BACE-1 e a BACE-2, no entanto, estudos já demonstraram que a BACE-1 é a principal β -secretase (Annaert e Strooper, 2002). A BACE-1 é responsável pelo primeiro passo na clivagem da APP na porção aminoterminal liberando β -sAPP. Posteriormente, a clivagem é realizada por um complexo de proteínas (presenilina 1 e 2, nicastrina e Aph-1) denominado γ -secretase dando origem aos peptídeos A β (Bossy-Wetzel, 2004; Vassar et al., 1999).

A via não amiloidogênica de processamento da APP é representada por enzimas denominadas α -secretases. As enzimas candidatas à atividade de α -

secretases são membros de uma família de metaloproteases (ADAM) incluindo ADAM9, ADAM10 e ADAM17 ou enzima conversora do fator de necrose tumoral-alfa (TACE) (Buxbaum et al., 1998; Hartmann et al., 2002). Além da sua participação na clivagem da APP, a TACE é capaz de agir como enzima conversora do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Alguns autores sugerem que a TACE possa exercer um papel importante na regulação da atividade de α -secretase, uma vez que a inibição da enzima em cultura de células afeta tanto a secreção de APP- α quanto a formação do peptídeo amiloide (Buxbaum et al., 1998).

Um dos produtos da clivagem da APP pelas enzimas α -secretases é a porção N-terminal denominada APP- α que pode ser posteriormente clivada pela enzima γ -secretase liberando um pequeno peptídeo denominando P3. O produto da clivagem da α -secretase, APP- α , tem sido associado à plasticidade sináptica e neuroproteção (Tachida et al., 2008; Turner et al., 2003). Neste contexto, um estudo realizado com ratos de 23 meses demonstrou uma diminuição de APP- α no líquido cefalorraquidiano (LCR) associada a um prejuízo na memória espacial de ratos envelhecidos (Anderson et al., 1999). Além disso, alguns autores sugerem que um aumento na atividade da TACE levando a níveis elevados de APP- α podem estar relacionados a efeitos neurotróficos e melhora cognitiva (Sánchez-Alavez et al., 2007; Tachida et al., 2008). Apesar das evidências demonstradas de que a atividade da TACE e seus produtos possam exercer efeitos neuroprotetores, não existem estudos avaliando o papel da via não-amiloidogênica durante o processo de envelhecimento fisiológico. Além disso, embora um grande número de evidências tenha associado o peptídeo A β e a atividade das enzimas secretases à doença de Alzheimer, poucos estudos têm

avaliado o papel das enzimas responsáveis pela clivagem da APP durante o envelhecimento fisiológico.

1.3. Exossomos

Nos últimos anos, alguns autores têm sugerido que o peptídeo A β , envolvido na fisiopatologia da DA, poderia ser liberado via exossomos facilitando a formação de placas amiloides e a propagação da doença (Rajendran et al., 2006, 2014). Além disso, recentemente, Fiandaca e colegas (2015) sugeriram que os peptídeos A β associados aos exossomos periféricos poderiam ser utilizados como biomarcadores da progressão da DA.

Os exossomos são pequenas vesículas esféricas originadas através da invaginação da membrana de corpos multivesiculares presentes na via endocítica. Essas vesículas ficam armazenadas no interior de corpos multivesiculares e são secretadas para o espaço extracelular quando estes se fundem à membrana citoplasmática, como ilustrado na Figura 2 (Kourembanas, 2015; Perez-Gonzalez et al., 2012; Simpson et al., 2008).

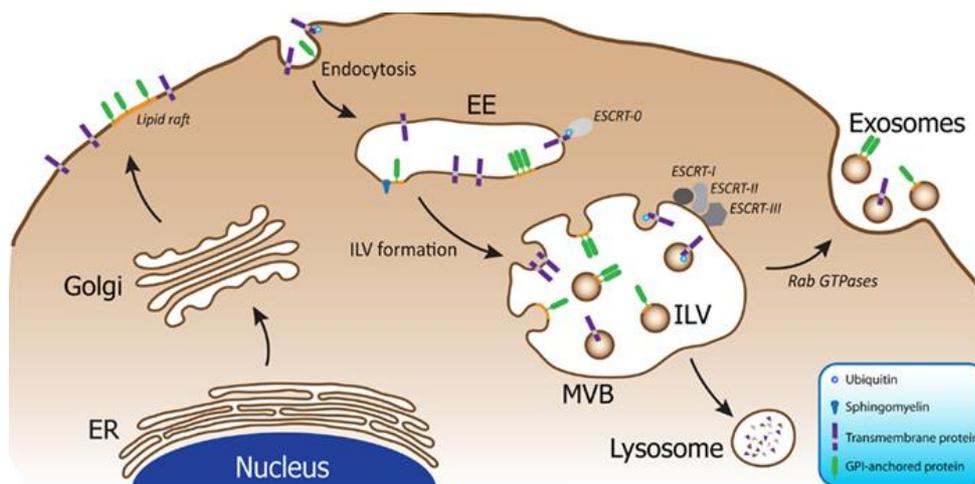


Figura 2. Biogênese dos exossomos a partir da membrana dos corpos multivesiculares e secreção para o espaço extracelular. EE- endossomos precoces; MVB- corpos multivesiculares; ER- retículo endoplasmático (Bellingham et al., 2012).

Diversos tipos de células como neurônios, astrócitos, microglia e plaquetas podem secretar exossomos para o espaço extracelular, além disso, essas vesículas podem ser isoladas de meios de cultura e de vários fluidos corporais como soro, plasma, urina e LCR (Bellingham et al., 2012; Gupta e Pulliam, 2014; Lee et al., 2012).

A diversidade da composição dos exossomos conforme o local de origem e a possibilidade de os mesmos serem isolados de diversos fluidos biológicos sugerem que as vesículas possam ser utilizadas como biomarcadores célula-específicos. Os exossomos podem ser diferenciados de outros tipos de vesículas, pois apresentam proteínas específicas tanto de membrana quanto intracelulares, como ilustrado na Figura 3. Ainda, devido a origem endocítica, os exossomos possuem proteínas envolvidas na fusão e transporte (anexinas e Rab proteínas), proteínas de choque, moléculas de adesão, enzimas metabólicas, proteínas de transdução de sinal (quinases e proteínas G) além de serem enriquecidos com tetraspaninas como a CD63 e CD81 (Bellingham et al., 2012, Vaccari et al., 2015).

As tetraspaninas tem sido amplamente utilizadas como marcadores de exossomos, além disso, alguns autores têm sugerido a acetilcolinesterase (AChE) como uma enzima típica presente em exossomos (Perez-Gonzalez et al., 2012). No entanto, visto que uma diminuição do sistema colinérgico central parece possuir um papel central no processo neurodegenerativo e no declínio cognitivo associado à idade (Haider et al., 2014; Weinreb et al., 2015) o potencial uso da AChE como marcador de exossomos durante o envelhecimento necessita de mais estudos.

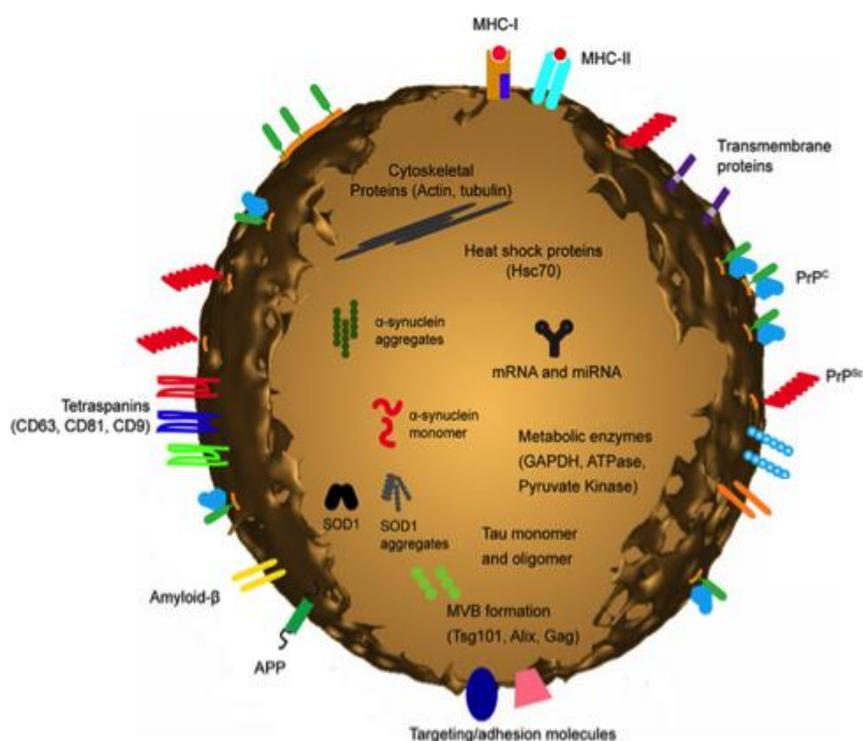


Figura 3. Composição dos exossomos: proteínas específicas de membrana e proteínas intracelulares (Lee et al., 2012).

Embora o papel dos exossomos ainda não esteja totalmente elucidado, uma das primeiras funções associada a estas vesículas foi a de carreadores de proteínas indesejadas e toxinas para degradação, uma função de “limpeza” celular (Gupta & Pulliam, 2012; Tickner et al., 2014). No entanto, estudos

recentes têm demonstrado que estas vesículas são especializadas em comunicação intercelular de longa distância facilitando a transferência de proteínas, mRNAs e microRNAs funcionais (Brites & Fernandes., 2015; Haney et al., 2013). A capacidade dos exossomos em realizar a função de transferência parácrina de diversas substâncias deve-se à facilidade de interação e fusão das membranas, expressão de proteínas adesivas e vetores ligantes específicos como tetraspaninas, integrinas e outros receptores presentes nas membranas, ilustrado na Figura 4 (Haney et al., 2013).

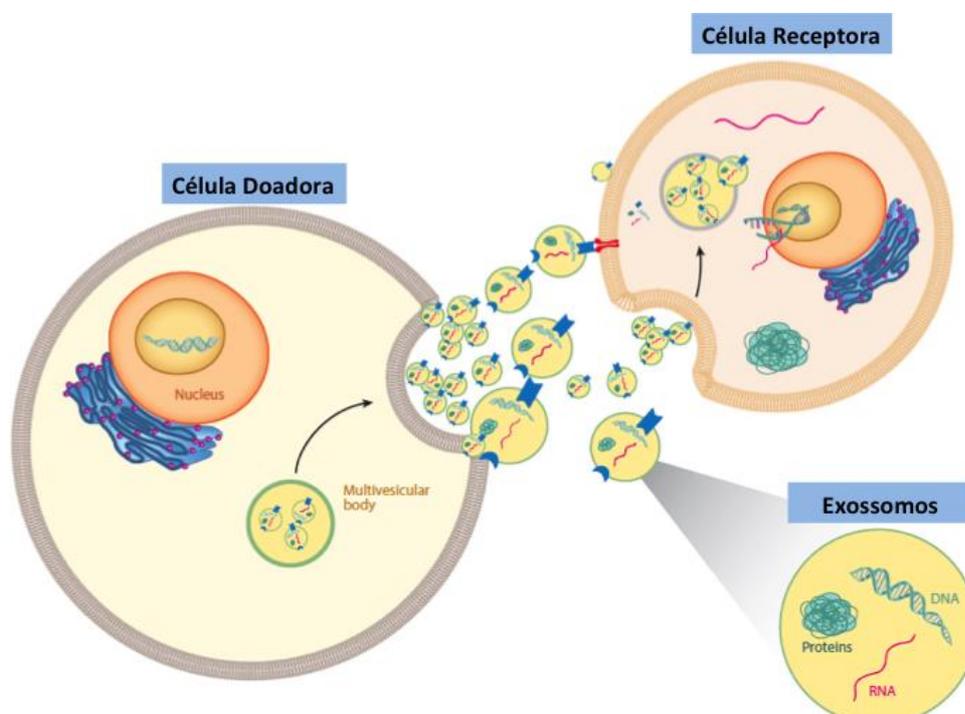


Figura 4. Comunicação célula-célula realizada pelos exossomos e transferência parácrina do conteúdo (Kourembanas, 2015).

Os exossomos são responsáveis por mediar vários processos indispensáveis ao funcionamento fisiológico cerebral, no entanto, como citado anteriormente, eles também podem estar envolvidos na patogênese de diversas doenças tanto de natureza infecciosa quanto neurodegenerativa como a DA (An et al., 2013; Brites & Fernandes, 2015; Gupta & Pulliam, 2014). Além disso,

algumas proteínas como proteína príon, α -sinucleína, proteína tau e a superóxido dismutase (SOD1) podem ser liberadas para o LCR associadas aos exossomos (Fevrier et al. 2004; Gomes et al. 2007; Rajendran et al. 2006).

Neste contexto, o uso de exossomos para o diagnóstico e prognóstico de doenças neurodegenerativas como a DA tem sido proposto. Como citado anteriormente, recentemente, um estudo demonstrou níveis elevados de A β tanto em pacientes pré-clínicos quanto em pacientes sintomáticos diagnosticados com DA (Fiandaca et al., 2015). Embora os exossomos tenham sido associados a condições patológicas relacionadas à idade avançada como a DA (Chang et al., 2013; Rajendran et al., 2006) poucos estudos têm investigado o envolvimento destas vesículas no processo de envelhecimento fisiológico. Lehmann e colegas (2008) demonstraram um aumento na liberação de exossomos utilizando um modelo de senescência *in vitro* com fibroblastos humanos e células tumorais prostáticas. Ainda, uma revisão realizada por Xu & Tahara (2013) sugere que a ativação do p53 levaria ao aumento da expressão de fatores relacionados à maior produção e liberação de exossomos em células senescentes. Apesar dos resultados já descritos sobre o papel dos exossomos em modelos celulares de envelhecimento trabalhos avaliando essa relação *in vivo* são necessários.

Alguns estudos têm demonstrado um possível papel dos exossomos durante o estresse oxidativo. Em relação a condições patológicas, como durante o choque séptico, alguns autores observaram que os exossomos circulantes são capazes de produzir espécies reativas intrinsecamente (Azevedo et al., 2007; Janiszewski et al., 2004). Além disso, recentemente, Fröhlich & colegas (2014) demonstraram um papel dos exossomos na transferência de moléculas com

atividade antioxidante, especificamente a SOD e a catalase, entre oligodendrócitos e neurônios.

Assim como o SNC, a circulação sanguínea possui uma grande quantidade de microvesículas circulantes, e algumas evidências sugerem que a concentração, a composição e o perfil molecular dessas vesículas possam refletir as condições fisiológicas e patofisiológicas do corpo. Entre as células responsáveis pela liberação de exossomos, as plaquetas e as células mononucleares parecem contribuir com grande parte das vesículas extracelulares circulantes nos fluídos corporais, incluindo os exossomos (Gupta & Pulliam, 2014). Estudos sugerem que as vesículas circulantes poderiam atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) e exercer efeitos biológicos no SNC, tanto pela liberação da sua carga neurotóxica no espaço extracelular quanto através de diferentes vias de sinalização ativadas por ligantes e receptores presentes na sua superfície (Alvarez-Erviti et al., 2011; Gupta & Pulliam, 2014).

Além disso, visto que originalmente os exossomos foram descritos como vesículas responsáveis pela degradação de proteínas e toxinas, e diversas evidências demonstram que um acúmulo de materiais indesejados, como aqueles provenientes do estresse oxidativo, podem levar à rápida progressão do processo de envelhecimento (Brunk & Terman, 2002b; Terman & Brunk, 2004), estudos avaliando essa relação são interessantes.

1.4. Estresse oxidativo

Como citado anteriormente, os exossomos parecem estar relacionados ao estresse oxidativo tanto através da geração intrínseca de espécies reativas quanto através da transferência de enzimas antioxidantes como a catalase (CAT)

e a SOD entre células neurais. Embora o estresse oxidativo esteja amplamente descrito como parte do processo de envelhecimento e os exossomos possam exercer um papel tanto no envelhecimento quanto no estado oxidativo, ao nosso conhecimento, não existem estudos avaliando esta relação.

Entre as diferentes teorias sugeridas para explicar o processo de envelhecimento, a teoria do envelhecimento pelos radicais livres continua recebendo grande atenção mesmo após diversos anos de estudo. Esta teoria sugere que o envelhecimento é consequência do acúmulo de efeitos deletérios ocasionados pelos radicais livres e que a capacidade de defesa do organismo aos danos celulares induzidos pelas espécies reativas poderia determinar sua expectativa de vida (Harman, 1956; Harman, 1992).

As espécies reativas são átomos ou moléculas que contém elétrons desemparelhados em sua camada mais externa, caracterizadas por grande instabilidade e elevada reatividade (Reis et al., 2008). O radical ânion superóxido e o radical hidroxila estão entre as espécies reativas mais bem descritas (Ferreira et al., 1997). As espécies reativas podem ser formadas de forma exógena e endógena sendo a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial a principal fonte intracelular de espécies reativas (Beal, 2005; Dasuri et al., 2013). Tanto as espécies reativas do oxigênio quanto as do nitrogênio possuem um importante papel nos processos biológicos como crescimento e sinalização celular (Lander, 1997; Zheng & Storz, 2000). No entanto, o aumento excessivo das espécies reativas pode levar ao dano em proteínas celulares, DNA, lipídeos e polissacarídeos (Andreyev et al., 2005; Zorov et al., 2014).

O organismo possui um sistema de defesas antioxidantes responsável por combater a produção excessiva de radicais livres. O sistema antioxidante é

formado por componentes enzimáticos como as enzimas glutationa peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) como ilustrado na Figura 5, além de componentes não-enzimáticos como a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol) e glutationa reduzida (Dasuri et al., 2013; Uttara et al., 2009). A enzima SOD possui um importante papel antioxidante através da sua ação catalisadora da reação do radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogênio e água. Já foram descritas na literatura três isoformas distintas da enzima, SOD-cobre e zinco (SOD1), SOD manganês (SOD2) e SOD extracelular (SOD3) (Dasuri et al., 2013). Além do papel antioxidante desenvolvido pela SOD, algumas isoformas da enzima como a SOD1 e a SOD2 estão associadas a efeitos benéficos em patologias como a DA. Estudos demonstraram que o aumento da expressão da SOD é capaz de diminuir a suscetibilidade celular à neurotoxicidade do peptídeo A β (Celsi et al., 2004), além disso em camundongos knockout para as isoformas SOD1 e SOD2, foi observado um aumento na formação de placas amiloides, prejuízo cognitivo e disfunção neuronal (Murakami et al., 2011).

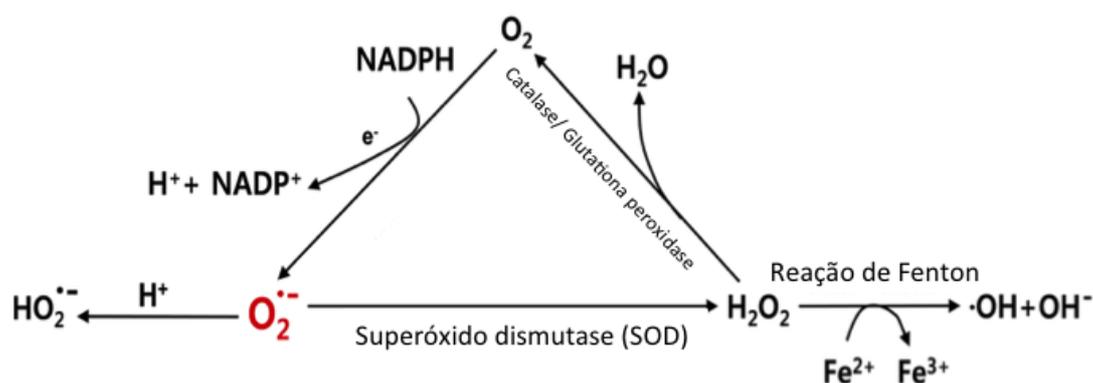


Figura 5. Esquema representativo da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) (adaptado de Kim et al., 2015).

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas e a sua remoção através das defesas antioxidantes, o qual

pode ocorrer tanto pela produção excessiva de espécies reativas assim como pela diminuição das defesas antioxidantes, ou ambos os processos (Halliwell & Cross, 1994; Sies, 1985). Diversos trabalhos sugerem que o estresse oxidativo possui um papel importante no desenvolvimento do processo neurodegenerativo associado à idade assim como no aumento da suscetibilidade à DA (Bar-Am et al., 2015; Fukui & Schulz et al., 2000). Neste contexto, estudos demonstram que o acúmulo de A β poderia levar ao aumento de espécies reativas e posterior estresse oxidativo, o qual poderia acelerar a progressão da DA (Murakami et al., 2005; Tabner et al., 2005a). Além disso, o estresse oxidativo é capaz de aumentar a produção de A β levando a um ciclo vicioso potencialmente prejudicial (Atwood et al., 2003; Tabner, 2005b).

Visto que o estresse oxidativo é um processo observado durante o envelhecimento fisiológico além de participar da fisiopatologia de diferentes doenças neurodegenerativas, tanto o conteúdo de espécies reativas quanto a atividade das enzimas antioxidantes têm sido amplamente avaliadas no SNC. O cérebro é um órgão extremamente vulnerável aos efeitos das espécies reativas devido a sua alta demanda de oxigênio, altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas neuronais e níveis diminuídos de defesas antioxidantes (Halliwell 2006; Kim et al., 2015). Estudos experimentais têm demonstrado um aumento de espécies reativas e lipoperoxidação em diferentes regiões cerebrais além de diminuição no conteúdo e atividade do sistema antioxidante durante o processo de envelhecimento (Driver et al., 2000; Siqueira et al., 2005). No entanto, embora a maioria dos estudos avalie os marcadores de estresse oxidativo no SNC, níveis elevados de marcadores de dano oxidativo também podem ser detectados periféricamente em sangue total assim como em

plasma e urina (Dalle-Donne et al., 2006). Como exemplo, espécies reativas e enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT parecem estar alteradas periféricamente na doença de Parkinson (Ilic et al., 1999; Kalra et al., 1992; Kocatürk et al., 2000). Em outro estudo, Kawamoto e colegas (2005) demonstraram que tanto durante o envelhecimento fisiológico quanto na DA alterações de marcadores de estresse oxidativo como de lipoperoxidação e atividade antioxidante podem ser detectados periféricamente em plaquetas e eritrócitos. Além disso, níveis elevados de isoprostanos, um marcador da peroxidação lipídica, foram observados no cérebro, plasma e urina de um modelo de camundongo transgênico de DA mostrando uma clara relação entre marcadores de estresse oxidativo centrais e periféricos (Praticò et al., 2001).

Alterações na permeabilidade da BHE durante o envelhecimento e em algumas doenças neurodegenerativas estão amplamente descritas na literatura (Abbott, 2000; Girouard & Iadecola, 2006). Em uma revisão realizada por Farrall & Wardlaw (2009), os autores sugerem que uma alteração na permeabilidade da BHE poderia ser usada como uma rota para que substâncias da periferia como metabólitos, proteínas e agentes infecciosos pudessem atingir o SNC e afetar diversas funções incluindo a cognição. Neste contexto, é possível sugerir que espécies reativas produzidas no tecido cerebral possam atingir a corrente sanguínea assim como aquelas produzidas periféricamente poderiam afetar o SNC (Chámatalová et al., 2016; Farrall & Wardlaw, 2009). No entanto, apesar de algumas evidências demonstrarem uma possível relação entre marcadores de estresse oxidativo centrais e periféricos, o mecanismo envolvido neste processo, principalmente durante o envelhecimento, ainda precisa ser melhor estudado.

1.5. Exercício físico no processo de envelhecimento

Entre as diferentes ferramentas terapêuticas não farmacológicas estudadas, o exercício físico tem recebido grande atenção devido a sua capacidade regenerativa e efeitos benéficos tanto em tecidos periféricos quanto no SNC (Baker et al. 2011; Shefer et al. 2010; van Praag et al., 1999 a,b, 2005). Neste contexto, de acordo com um guia publicado pela Organização Mundial da Saúde o exercício físico é uma forma eficiente e barata de prevenir o declínio da capacidade funcional geral em pessoas com idade avançada. Além disso, a atividade física pode prevenir e modular algumas doenças crônicas associadas ao processo de envelhecimento (Cvecka et al., 2015; WHO, 2007). Entre os diversos efeitos benéficos relacionados à atividade física durante o envelhecimento destacam-se maior independência nas atividades de autocuidado, melhora da autoestima, melhor qualidade e expectativa de vida e diminuição da mortalidade (Awick et al., 2015; Cvecka et al., 2015; Rejeski & Mihalko, 2001).

O SNC possui uma importante capacidade de modificar-se estruturalmente e funcionalmente em resposta a influências ambientais. Neste contexto, algumas regiões cerebrais consideradas vulneráveis às alterações relacionadas à idade demonstram modificações estruturais e funcionais em resposta ao exercício físico moderado (Kirk-Sanchez & McGough, 2014). Alguns autores sugerem que os efeitos do exercício aeróbico sobre o cérebro são tanto gerais quanto específicos; gerais pois diversas regiões cerebrais são afetadas pela realização do exercício, e específicos uma vez que em algumas regiões cerebrais, como o hipocampo e o córtex pré-frontal, os resultados do exercício são mais pronunciados (Erickson et al., 2012). Alterações como aumento da

plasticidade sináptica e neurotransmissão, assim como aumento na expressão de genes de fatores do crescimento, já foram descritos em hipocampus de camundongos e ratos fisicamente ativos (Cotman & Berchtold, 2002; Farmer et al., 2004; van Praag et al., 1999a). Portanto, é possível sugerir que a atividade física possa melhorar a função cerebral e impactar de forma positiva no desempenho cognitivo (Erickson et al., 2012). Além disso, uma revisão publicada em 2012, por Erickson e colaboradores, afirma que mesmo um regime de exercício aeróbico moderado iniciado em idosos sedentários pode promover benefícios. Os autores sugerem que uma quantidade relativamente modesta de atividade física é suficiente para promover alterações estruturais e consequente melhora cognitiva durante o envelhecimento.

Diversos estudos utilizando tanto exercício forçado (esteira ou nado) quanto exercício voluntário (roda de corrida de livre acesso) têm observado efeitos positivos em parâmetros cognitivos em modelos animais, especialmente, sobre a memória (Erickson et al., 2012; Lovatell et al., 2013; Radak et al. 2001; van Praag et al. 2005). Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que um protocolo de exercício de corrida diário moderado (20 min por dia durante 2 semanas) em esteira ergométrica foi capaz de melhorar transitoriamente a memória aversiva avaliada no teste da esQUIVA INIBITÓRIA em ratos Wistar de 20 meses de idade (Lovatell et al., 2012, 2013). Outro estudo realizado com camundongos de 19 meses de idade expostos à roda de corrida de livre acesso durante 1 mês resultou em melhora no aprendizado e retenção de memória no teste do labirinto aquático (van Praag et al. 2005).

Os efeitos positivos da atividade física sobre parâmetros cognitivos têm sido amplamente descritos, no entanto, existem diversas vias pelas quais as

regiões cerebrais envolvidas nas funções cognitivas podem ser alteradas ou melhoradas através do exercício físico (Erickson et al., 2012). Alguns mecanismos relacionados à prática de exercício como aumento da angiogênese e neurogênese, aumento nos níveis de neurotransmissores e fatores neurotróficos, diminuição do processo inflamatório e estresse oxidativo assim como redução no acúmulo desordenado de proteínas já foram descritos (Kerr et al., 2010; Lovatell et al., 2013; Neeper et al., 1996; Rao et al., 2015; van Praag et al., 2005).

Nas últimas décadas, diversas evidências têm sugerido um importante papel do exercício físico na melhora dos déficits de memória associados à doença de Alzheimer. Neste contexto, tanto os efeitos do exercício físico forçado quanto voluntário têm demonstrado efeitos sobre o processamento da APP e o depósito do peptídeo A β (Adlard et al., 2005, Albeck et al., 2006; Di Loreto et al., 2014; Liu et al., 2013; Xu et al., 2013). Recentemente, Zhao e colegas (2015) demonstraram efeitos benéficos do exercício em esteira através da diminuição de placas amiloides hipocampais acompanhado por melhora na memória espacial em camundongos transgênicos APP/PS1. Corroborando estes dados, um protocolo de exercício voluntário foi capaz de reduzir os níveis de agregação do peptídeo A β e da atividade da BACE em hipocampo e córtex em modelo transgênico de DA, além de promover melhora da memória (Rao et al., 2015). Como descrito acima, estudos avaliando os efeitos do exercício físico sobre a memória relacionada ao processamento da APP pelas secretases geralmente são realizados utilizando modelos transgênicos da DA, porém estudos avaliando essa relação durante o processo de envelhecimento fisiológico são raros.

Os efeitos benéficos do exercício físico sobre diferentes parâmetros de estresse oxidativo também estão descritos na literatura. A prática de exercício

físico regular tem se mostrado eficiente como medida preventiva em doenças associadas ao estresse oxidativo como doenças cardiovasculares e infarto (Hammeren et al., 1992; Wannamethee et al., 1998). Além disso, diversos estudos avaliando os efeitos do exercício sobre parâmetros de estresse oxidativo durante o envelhecimento sugerem que a atividade física regular é capaz de melhorar as defesas antioxidantes e reduzir o dano causado pelas espécies reativas (Fatouros et al., 2004; Fraile-Bermúdez et al., 2015).

Embora a maioria dos trabalhos encontrados na literatura relatem efeitos benéficos do exercício sobre o SNC, esses efeitos também podem ser encontrados em marcadores periféricos como na circulação sanguínea. Além disso, o impacto do exercício em proteínas circulantes pode refletir alterações ao nível do SNC. Alguns autores observaram que níveis periféricos elevados de fatores do crescimento como fator de crescimento endotelial vascular 1 (IGF-1) estimulado pelo exercício podem, pelo menos em parte, mediar um aumento na neurogênese (Fabel et al., 2003; Trejo et al., 2001).

Neste contexto, é importante citar que recentemente, Frühbeis e colegas (2015) demonstraram um aumento na liberação de pequenas vesículas para a circulação associado à prática de exercício físico. Ainda, visto que evidências demonstram a capacidade dos exossomos transportarem diversas substâncias entre diferentes células e atravessarem a BHE, é possível sugerir um papel destas vesículas nos efeitos centrais e periféricos induzidos pelo exercício.

Desta forma, avaliar os efeitos do exercício físico tanto sobre o SNC quanto sobre marcadores periféricos durante o processo de envelhecimento é de fundamental importância, pois a compreensão dos mecanismos pelos quais a

prática de exercício físico resulta em efeitos benéficos pode endossar sua utilização como uma ferramenta terapêutica adjuvante.

2. Hipóteses

As nossas hipóteses de trabalho pressupõem que o envelhecimento poderia levar ao desequilíbrio das vias amiloidogênica e não-amiloidogênica, a favor da amiloidogênica, e que o exercício físico seria capaz de modular a atividade das secretases especialmente no processo de envelhecimento. Adicionalmente, esperávamos que tanto o envelhecimento quanto o exercício físico alterariam o perfil de exossomos circulantes.

3.Objetivo

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do envelhecimento e do exercício físico sobre as atividades das secretases e sobre o perfil de exossomos circulantes.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre a memória aversiva utilizando o teste da esQUIVA inibitória em ratos Wistar de 3, 21 e 26 meses de idade.
- Avaliar o efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre as atividades da TACE e da BACE em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar de 3, 21 e 26 meses de idade.
- Avaliar o efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre o conteúdo de APP em hipocampo de ratos Wistar de 3, 21 e 26 meses de idade.
- Avaliar o efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre o conteúdo de CD63 e atividade da AChE em exossomos circulantes de ratos Wistar de 3, 21 e 26 meses de idade.
- Avaliar o efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre o conteúdo de espécies reativas e atividade da SOD em exossomos circulantes de ratos Wistar de 3, 21 e 26 meses de idade.
- Avaliar o efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre o conteúdo do peptídeo A β 1-42 em exossomos circulantes de ratos Wistar de 3, 21 e 26 meses de idade.
- Avaliar os efeitos transitórios (1 hora) e tardios (18 horas) após a última sessão de exercício físico sobre os parâmetros bioquímicos analisados.

4. Abordagem Metodológica

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3, 21 e 26 meses de idade provenientes do Centro de Reprodução de Animais de Laboratório (CREAL-UFRFGS). Os animais foram mantidos no Biotério setorial do Departamento de Farmacologia (UFRGS) durante o processo de envelhecimento em condições padrão de biotério com 12 horas de claro/escuro, temperatura controlada (22 ± 2 °C), comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA) (número do projeto #23464).

As idades dos animais foram escolhidas baseadas em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa em que observamos uma capacidade do protocolo de exercício físico modular parâmetros oxidativos, inflamatórios e epigenéticos em diferentes regiões cerebrais como hipocampo e córtex pré-frontal de ratos adultos jovens (3 meses de idade) e ratos envelhecidos (20-21 meses de idade) (Cechetti et al., 2008; Cechinel et al., 2016; Elsner et al., 2012; 2013; Lovatel et al., 2013; Spindler et al., 2014). Além disso, animais de 26 meses de idade foram incluídos no estudo com base no trabalho de Takahashi e colegas (2010), o qual demonstrou um aumento nos níveis do peptídeo A β 1-42 em cérebro de ratos saudáveis de 26 meses de idade.

4.2. Desenho experimental

Neste trabalho foram utilizados 89 ratos Wistar machos, os animais foram divididos em 12 grupos experimentais conforme ilustrado na Figura 6.

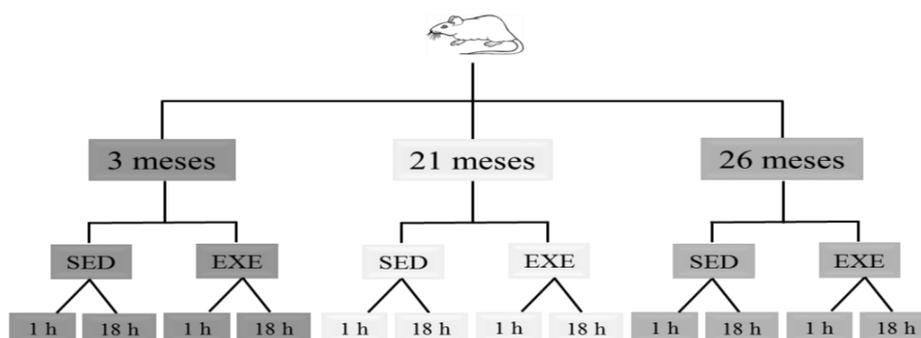


Figura 6. Desenho esquemático dos grupos experimentais (12 grupos).

Os animais de 3, 21 e 26 meses de idade foram divididos em sedentários (SED) e exercitados (EXE), e ambos os grupos foram submetidos ao teste da esQUIVA inibitória ($n= 12-20$), 30 minutos após o término da última sessão de exercício físico (Figura 7). Após a esQUIVA inibitória, os animais foram subdivididos, randomicamente, em grupos 1h ou 18h com o objetivo de verificar os efeitos transitórios (1 hora) e tardios (18 horas) do protocolo de exercício físico sobre os parâmetros bioquímicos ($n= 4-9$).

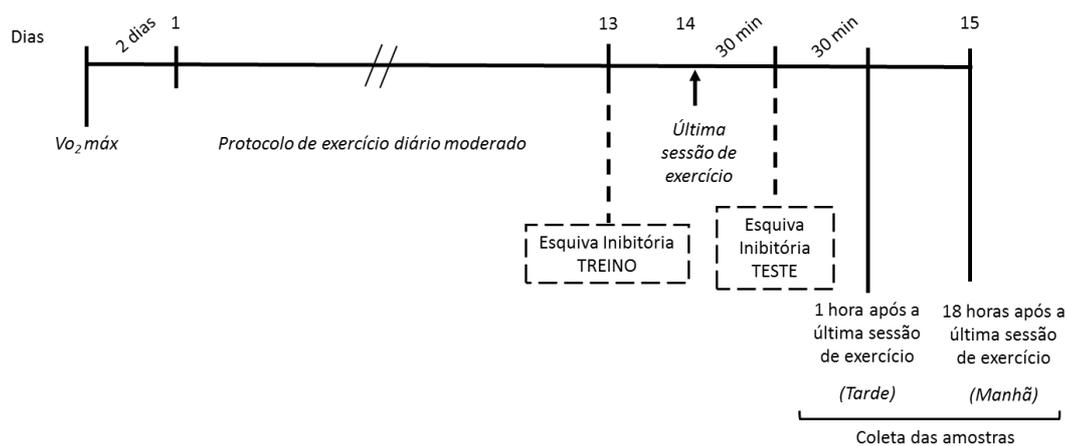


Figura 7. Linha do tempo do protocolo de exercício físico, do teste da esQUIVA inibitória e da coleta das amostras.

4.3. Protocolo de exercício físico

O exercício consistiu em sessões de corrida realizadas em esteira ergométrica adaptada para ratos como demonstrada na Figura 8 (AVS Projetos, São Paulo, Brazil) utilizando protocolo diário moderado de corrida (20 min por dia durante 2 semanas).



Figura 8. Esteira ergométrica adaptada para ratos

Para determinar a velocidade de corrida durante os treinos foi utilizada a medida de consumo máximo de oxigênio indireto ($VO_{2m\acute{a}x}$) (Brooks & White 1978). Cada animal correu na esteira a uma velocidade inicial baixa seguida por incrementos de 5m/min a cada 3 min até atingir seu ponto de exaustão (incapacidade do rato em continuar correndo). O tempo de fadiga (em minutos) e a velocidade máxima (em m/min) foram tomados como índice da capacidade de exercício e usados para a mensuração de $VO_{2m\acute{a}x}$ indireto (Elsner et al., 2013;

Lovatel et al., 2013). Durante o protocolo de treino, todos os animais correram a 60% do seu consumo máximo de oxigênio (VO₂máx) como ilustrado na Tabela 1. Os animais que se recusaram a correr foram gentilmente estimulados. Não foram utilizados choque elétrico ou outras formas de estímulo aversivo nos animais exercitados.

Previamente, nosso grupo de pesquisa demonstrou o efeito neuroprotetor deste protocolo diário moderado de corrida em esteira uma vez que o mesmo foi capaz de reduzir o dano isquêmico *in vitro* em fatias hipocâmpais de ratos Wistar (Scopel et al., 2006). Além disso, recentemente, os efeitos neuroprotetores deste protocolo foram descritos sobre a memória aversiva assim como em diferentes parâmetros bioquímicos em regiões cerebrais de ratos Wistar (Cechinel et al., 2016; Elsner et al., 2012; 2013; Lovatel et al., 2013; Spindler et al., 2014). Os animais do grupo sedentário foram colocados diariamente na esteira ergométrica desligada durante 5 minutos com o objetivo de submetê-los às mesmas condições e manipulação sofrida pelos animais exercitados. Os procedimentos foram realizados no período entre 14:00 e 17:00 horas.

Tabela 1. Protocolo de exercício físico diário moderado em esteira ergométrica.

Período adaptação (1-2 dias)	1-2 min	2-6 min	6-14 min	14-18 min	18-20 min
	VO ₂ max 40%	VO ₂ max 50%	VO ₂ max 60%	VO ₂ max 50%	VO ₂ max 40%
Ratos adultos jovens (3 meses)	7 m/min	8.6 m/min	10.4 m/min	8.6 m/min	7 m/min
Ratos envelhecidos (21\26 meses)	5.86 m/min	7.34 m/min	8.8 m/min	7.34 m/min	5.86 m/min
Protocolo de treino (3-14 dias)	1-4 min	4-16 min		16-18 min	
	VO ₂ max 40%	VO ₂ max 60%		VO ₂ max 40%	
Ratos adultos jovens (3 meses)	7 m/min	10.4 m/min		7 m/min	
Ratos envelhecidos (21\26 meses)	5.86 m/min	8.8 m/min		5.86 m/min	

4.4. Teste da Esquiva Inibitória

O teste da esquiva inibitória foi utilizado como um modelo estabelecido de memória motivada pelo medo no qual os animais aprendem a associar a sua localização no aparato (grade presente no chão) ao estímulo aversivo (choque elétrico). O aparato do teste da esquiva inibitória consiste em uma caixa de acrílico 50 x 25 x 25 cm (Albarsch, Porto Alegre, Brasil), cujo chão é composto por barras de aço inoxidável (1 mm de diâmetro), espaçados por 1 cm de distância. O aparato também possui uma plataforma no canto esquerdo com 7 cm de largura e 2,5 cm de altura (Figura 9).



Figura 9. Aparato da esquiva inibitória

O paradigma da esquiva inibitória consiste em uma sessão treino e 24 horas após, uma sessão teste. Na sessão de treino, os animais foram colocados em uma plataforma e ao descerem com as quatro patas na região da grade, receberam um choque de 0,6 mA durante 3 segundos e foram colocados de volta na plataforma. Para avaliar a memória de longo prazo, 24 horas após o treino os animais foram submetidos novamente ao mesmo aparato, sem choque elétrico, e

o tempo de latência para descida da plataforma foi cronometrado (tempo máximo de 180 segundos) e usado como medida de memória de retenção (Amaral et al., 2007). O teste comportamental foi realizado 30 minutos após a última sessão de exercício físico. Os efeitos transitórios do exercício em esteira sobre a memória aversiva já foram previamente descritos pelo nosso grupo de pesquisa (Lovatell et al., 2012, 2013).

4.5. Preparo das amostras

Trinta minutos após o teste da esQUIVA inibitória e, conseqüentemente, 1 hora ou 18 horas após a última sessão de exercício os animais foram eutanasiados por decapitação. As amostras foram coletadas 1 hora e 18 horas após a última sessão de exercício com o objetivo de avaliar os efeitos transitórios e tardios, respectivamente, do protocolo de exercício utilizado. Além disso, é importante salientar que 1 hora após a última sessão de exercício correspondeu ao período da tarde enquanto que 18 horas após o exercício correspondeu ao período da manhã permitindo desta forma a avaliação do efeito do período do dia sobre os parâmetros bioquímicos.

Os animais foram decapitados em ambiente apropriado (baixa luminosidade, silencioso e longe de outros animais) por pesquisador com treinamento e experiência. O ambiente foi cuidadosamente higienizado antes do ingresso do animal na sala. A decapitação foi realizada em guilhotina adaptada para roedores (Insight®) sem anestesia prévia para não alterar bioquimicamente as estruturas estudadas. Os métodos utilizados seguem as conformidades propostas pelas “Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA”.

Após a decapitação, o sangue do tronco troncular foi coletado em tubos sem anticoagulante, centrifugado a 10,000 rpm em temperatura ambiente por 10 minutos e após, o soro resultante foi transferido para um tubo (1,5 mL) e armazenado a -80 °C para posterior isolamento dos exossomos. O encéfalo dos animais foi removido e colocado em solução fisiológica gelada 0,9%. Após, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram dissecados, rapidamente imersos em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados a -80 °C.

4.6. Quantificação da APP e atividade das secretases em hipocampo e córtex pré-frontal

4.6.1. Western blot

A técnica de Western blot foi realizada para avaliar o conteúdo de APP hipocampal. O hipocampo (n=4) foi homogeneizado com tampão RIPA (1:10, Millipore) e com inibidores de proteases e fosfatases (1:100, Sigma Aldrich, Missouri, USA). A concentração de proteínas foi quantificada através do método do azul de Coomassie (Bradford, 1976), e a amostra foi incubada com solução Laemmli (5 min/95 °C). As proteínas (40 µg) foram separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE, 1.5 mm, 120 volts) e transferidas para uma membrana PVDF (Millipore). A membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado a 4% em TBS-T e incubada com o anticorpo primário anti-APP (Millipore, 1:5000) e GAPDH (Cell Signaling, 1:5000) overnight a 4°C. Posteriormente, a membrana foi novamente incubada com o anticorpo secundário (Cell Signaling, 1:1000) durante 2 horas a temperatura ambiente. Um substrato para western blot (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) foi usado e as proteínas imunorreativas foram visualizadas através de uma

exposição ao filme raio-X. As proteínas foram quantificadas pela mensuração da intensidade da banda (área X OD) usando um software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) e normalizadas pelo GAPDH.

4.6.2. Atividade da enzima β -secretase (BACE)

A atividade da enzima BACE foi avaliada utilizando um kit comercial específico (Abcam, #ab65357) de acordo com as instruções do fabricante. O hipocampo e o córtex pré-frontal (n=5-9) foram homogeneizados com tampão fornecido pelo kit e incubados no gelo durante 10 minutos. Após, o homogeneizado foi centrifugado $10,000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Em uma placa de 96 poços, $30 \mu\text{L}$ da amostra (proteína total $\approx 200 \mu\text{g}$) foram adicionados em cada poço seguido da adição de $70 \mu\text{L}$ do tampão de reação e de $2 \mu\text{L}$ do substrato para BACE. A placa foi incubada no escuro a 37°C durante 1 hora. A fluorescência foi mensurada através de um fluorímetro (345 nm de excitação e 520nm de emissão). A atividade da BACE foi expressa em unidades de fluorescência relativa (RFU) por mg de proteína.

4.6.3. Atividade da enzima α -secretase (TACE)

A atividade da TACE foi realizada utilizando um kit comercial conforme as instruções do fabricante (Anaspec Inc. #72085). O hipocampo e o córtex pré-frontal (n=5-9) foram homogeneizados em tampão de ensaio contendo 0.1% Triton-X 100. Após, foram incubados por 15 minutos a 4°C , centrifugados a $2,000 \times g$ a 4°C e o sobrenadante foi coletado. Em uma placa de 96 poços, $50 \mu\text{L}$ de amostra foram adicionados em cada poço seguida da adição de $50 \mu\text{L}$ do

substrato da TACE. A placa foi incubada protegida da luz durante 1 hora e após, 50 μ L da solução stop foi adicionada. A fluorescência foi mensurada através de um fluorímetro (490 nm de excitação e 520nm de emissão). A atividade da BACE foi expressa em unidade de fluorescência relativa (RFU) por mg de proteína.

4.7. Isolamento e perfil de exossomos circulantes

4.7.1. Isolamento dos exossomos circulantes

O isolamento dos exossomos do soro foi realizado utilizando um kit específico miRCURY™ Exosome Isolation Kit (Exiqon, MA, USA). Um volume de 0,6 mL de soro foi centrifugado por 5 minutos a 10,000 x g para a remoção de detritos celulares. Após, 0,5 mL do sobrenadante foi transferido para um vial onde foi adicionado 200 μ L de tampão de precipitação seguido de uma incubação de 60 minutos a 4°C. Após a incubação, uma nova centrifugação de 30 minutos a 1,500 x g foi realizada em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 270 μ L de tampão de ressuspensão usando um vórtex. Os exossomos isolados foram armazenados à -20 °C até o dia dos experimentos. O tamanho das partículas derivadas do soro foi quantificado através da análise de rastreamento de partículas (NTA) usando um sistema LM10-HS (Nanosight Ltd., Amesbury, UK). O software NTA indicou que o tamanho das nanopartículas estava entre 90- 300 nm.

4.7.2. Níveis de CD63 em exossomos

A especificidade do procedimento de isolamento de exossomos foi caracterizada através da presença de CD63, uma proteína de membrana específica de exossomos. Os níveis de CD63 foram mensurados através de um kit

comercial específico (ExoELISA kit, System Biosciences) seguindo as instruções do fabricante. Em uma placa de 96 poços, foram adicionadas 50 µl de proteínas padrão ou amostra de exossomos e incubadas overnight a 4 °C. Após a incubação, 50 µl do anticorpo primário específico para CD63 foi adicionado e incubado durante 1 hora em temperatura ambiente seguido pela incubação com o anticorpo secundário. No último passo, 50 µl do substrato (TMB) foi adicionado e a absorbância foi mensurada em 450 nm. Os níveis de CD63 foram calculados comparados a curva padrão/ mg de proteína total e os resultados foram expressos como porcentagem de controle onde o grupo SED adulto jovem foi considerado o 100%.

4.7.3. Níveis do peptídeo Aβ1-42 em exossomos

Um kit comercial específico (Sensolyte ELISA kit- AnaSpec, Fremont, CA) foi utilizado para mensurar os níveis do peptídeo Aβ1-42 conforme as instruções do fabricante. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µl dos padrões diluídos ou das amostras de exossomos derivados de soro além de 50 µl do anticorpo de detecção e incubados overnight a 4 °C. Após a incubação, 100 µl de solução substrato de TMB foi adicionado em cada poço seguido e a absorbância foi mensurada a 450 nm. Os níveis de Aβ1-42 foram quantificados usando uma curva padrão e normalizados pela proteína total.

4.7.4. Níveis de espécies reativas em exossomos

As espécies reativas foram quantificadas usando 2'-7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) com um "probe" (Lebel et al., 1990). Em uma placa de 96 poços, a amostra contendo os exossomos foi incubada com DCFH-DA

(100 mM) a 37 °C durante 30 minutos e a formação de derivados oxidados fluorescentes (DCF) foi monitorada em comprimentos de onda de excitação (488 nm) e emissão (525nm). O procedimento foi realizado no escuro e brancos contendo DCFH-DA (sem exossomos) foram processados para a mensuração da autofluorescência (Bertoldi et al., 2012; dos Santos et al., 2014). O conteúdo de espécies reativas foi mensurado usando uma curva padrão e normalizado pela proteína total.

4.7.5. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em exossomos

Para quantificar a atividade da SOD foi utilizado um kit comercial RANSOD (Randox Labs. San Diego, CA, USA). O kit utiliza o sistema xantina e xantina oxidase para a geração de radical superóxido, o qual reage com 2-(4-iodenafil) -3-(4-nitrofenol) -5-fenoltetrazolium formando o corante vermelho de formazan. A reação é realizada a 37 °C e a absorbância é mensurada a 505 nm. A inibição da produção do cromógeno é proporcional à atividade da SOD na amostra e os resultados (unidades de SOD) foram normalizados pela proteína total.

4.7.6. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em exossomos

A atividade da AChE foi avaliada através do método colorimétrico adaptado de Ellman e colegas (1961), usando acetilcolina iodada (Sigma, USA) como substrato. A taxa de hidrólise da acetilcolina iodada é mensurada a 412 nm através da liberação do composto tiol o qual produz coloração quando reage com DTNB (dos Santos et al., 2014). A atividade da AChE foi normalizada pela proteína total.

4.8. Quantificação de proteínas totais

O conteúdo de proteínas totais das estruturas cerebrais e do exossomos isolados do soro foi quantificado através do método do azul de Coomassie usando albumina bovina como padrão (Bradford, 1976).

4.9. Análise estatística

Os resultados do teste comportamental e da atividade das enzimas secretases foram expressos em média \pm DP. Os resultados relacionados ao perfil dos exossomos foram expressos como porcentagem de controle (média \pm DP), onde os animais SED adultos jovens foram considerados 100%. A Análise de Variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey foi utilizada tendo idade e exercício físico como fatores.

Uma vez que os resultados do conteúdo da APP foram classificados como não paramétricos, os mesmos foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis.

Em todos os testes realizados o nível de significância aceito foi $p < 0,05$. As análises foram realizadas nos programas estatísticos Statistical Package for the Social Science (SPSS), versão 20 e GraphPad Prism.

4.10. Considerações Éticas

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS, número 23464). Todos os experimentos realizados estiveram de acordo com os critérios

estabelecidos pela lei Arouca (11.794) e pelo “*Guide for Care and Use of Laboratory Animals*” (NIH publication No. 8023, revised 2011).

5. Resultados

5.1 Artigo I

Aging process alters hippocampal and cortical secretase activities of Wistar rat



Research report

Aging process alters hippocampal and cortical secretase activities of Wistar rats



Karine Bertoldi^a, Laura Reck Cechinel^a, Bruna Schallenger^d, Louisiana Meireles^a, Carla Basso^a, Gisele Agustini Lovatel^b, Lisiane Bernardi^c, Marcelo Lazzaron Lamers^c, Ionara Rodrigues Siqueira^{a,d,*}

^a Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Faculdade de Fisioterapia, Universidade Federal de Santa Catarina, Araranguá, Santa Catarina, Brazil

^c Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

HIGHLIGHTS

- Aged brains have an imbalance between amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways.
- Lower cortical TACE activity was linked to aging-induced aversive memory impairment.
- Treadmill exercise was unable to alter hippocampal and cortical secretase activities.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 August 2016

Received in revised form

26 September 2016

Accepted 30 September 2016

Available online 1 October 2016

Keywords:

Hippocampus

Prefrontal cortex

Amyloid precursor protein

BACE

TACE

Aging

ABSTRACT

A growing body of evidence has demonstrated amyloid plaques in aged brain; however, little attention has been given to amyloid precursor protein (APP) processing machinery during the healthy aging process. The amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways, represented respectively by β - and α -secretases (BACE and TACE), are responsible for APP cleavage. Our working hypothesis is that the normal aging process could imbalance amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways specifically BACE and TACE activities. Besides, although it has been showed that exercise can modulate secretase activities in Alzheimer Disease models the relationship between exercise effects and APP processing during healthy aging process is rarely studied. Our aim was to investigate the aging process and the exercise effects on cortical and hippocampal BACE and TACE activities and aversive memory performance. Young adult and aged Wistar rats were subjected to an exercise protocol (20 min/day for 2 weeks) and to inhibitory avoidance task. Biochemical parameters were evaluated 1 h and 18 h after the last exercise session in order to verify transitory and delayed exercise effects. Aged rats exhibited impaired aversive memory and diminished cortical TACE activity. Moreover, an imbalance between TACE and BACE activities in favor of BACE activity was observed in aged brain. Moderate treadmill exercise was unable to alter secretase activities in any brain areas or time points evaluated. Our results suggest that aging-related aversive memory decline is partly linked to decreased cortical TACE activity. Additionally, an imbalance between secretase activities can be related to the higher vulnerability to neurodegenerative diseases induced by aging.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aging process and age-related diseases are usually accompanied by cognitive decline and structural alterations in brain areas such as cortex and hippocampus [1–3]. Substantial data have shown that β -amyloid ($A\beta$) brain deposition, a 39 to 43 amino acid peptides derived from amyloid precursor protein (APP) is implicated in both Alzheimer disease (AD) and normal aging process [4–6]. Although

* Corresponding author at: Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, sala 313, 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

E-mail address: ionara@ufrgs.br (I.R. Siqueira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.09.066>

0166-4328/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

amyloid plaques have been found in aged human brain [7,8] little attention has been given to APP processing machinery during the healthy aging process.

APP can be proteolytically cleaved by amyloidogenic or non-amyloidogenic pathways. The amyloidogenic pathway comprises the sequential APP cleavages by β -secretase and γ -secretase leading to A β production [9,10]; β -secretase activity is represented by BACE (β -site APP-cleaving enzyme-1) [11]. There are paradoxical findings about the relationship between A β and cognitive performance since A β has demonstrated a dual neuromodulatory effect, which can improve or impair memory performance [12–15]. Moreover, recent *in vivo* imaging studies have failed to find any correlations between cognitive performance and amyloid deposition [16]. Taken together, we can suggest that in fact APP processing machinery rather than the A β levels is related to cognitive performance during the aging process.

The non-amyloidogenic APP processing pathway is represented by α -secretases. The members of a Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family, such as tumor necrosis factor (TNF)- α converting enzyme (TACE or ADAM17) and ADAM10 have α -secretase activity and generate α -APPs that play a role in synaptic plasticity, neuroprotection and synaptogenesis [17,18]. Although sAPP α levels are reduced in cerebrospinal fluid (CSF) of 23-month-old rats [19], to the best of our knowledge, there are no studies evaluating the non-amyloidogenic pathway role such as TACE activity during normal brain aging process. However, increased TACE activity and consequently higher sAPP α levels may be related to neurotrophic effects as synaptic formation and cognitive improvement [17,20].

A significant body of clinical and experimental evidences has indicated that regular physical exercise improves cognitive functions during normal aging and age-associated disorders [21–24]. The effects of forced and voluntary exercise protocols on A β -associated neuropathology and APP pathways processing have been investigated [25–29]. Recently, Zhao et al. [30] demonstrated that forced treadmill exercise ameliorates the spatial memory impairment accompanied by alterations in hippocampal plaques in APP/PS1 mice. In accordance, this transgenic model subjected to a voluntary exercise had improved memory, lower A β aggregation and BACE activity in hippocampus and cortex [31]. Despite these findings demonstrating that exercise can modulate secretase activities in AD models little is known regarding the relationship between APP processing and exercise effects during the healthy aging process.

Previously, we demonstrated that the treadmill exercise protocol used here (20 min/day during 2 weeks) was able to reduce *in vitro* ischemic damage in hippocampal slices of Wistar rats [32]. Besides, this forced exercise protocol transiently improved the inhibitory avoidance aversive memory performance in aged and young rats [33,34]. Recently, it has been described the impact of this neuroprotective protocol on inflammatory and epigenetic marks in hippocampus and frontal cortex of rats [33–37].

Our working hypothesis is that the normal aging process could imbalance amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways, specifically BACE and TACE activities. Moreover, we expect that our exercise protocol would be able to alter aging-induced impairments. Taken together, the aim of this study was to evaluate the effects of aging process and a daily running exercise protocol on hippocampal and cortical BACE and TACE activities in Wistar rats.

2. Methods

2.1. Animals

Male Wistar rats of different ages, 3-month-old ($n=38$), 21-month-old ($n=27$) and 26-month-old ($n=24$) were used. The

animals were provided by the Centro de Reprodução Animal de Laboratório (CREAL) and maintained under standard conditions (12-h light/dark, 22 ± 2 °C) with food and water *ad libitum*. All animal procedures and experimental conditions were approved by the Local Ethics Committee (CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais – UFRGS; nr.23464). Their ages were chosen based on previous studies by Takahashi et al. [10] describing increased A β 1–42 levels in brains of 26-month-old healthy rats. Additionally, work performed by our group demonstrated that this exercise protocol improves the cognitive performance of young adult and 20–21-month-old rats [33,34].

2.2. Treadmill exercise protocol

The animals were divided in sedentary (SED) or exercised groups (EXE). The aged groups, 21 and 26-month-old animals, had 12–14 rats per group; since we had control animals for each set of experiments and because the youngest animals (3-month-old) were taken as a control group an increased number per group was examined ($n=18–20$). Exercise training consisted of running sessions on a motorized rodent treadmill (AVS Projetos, São Paulo, Brazil) using a moderate daily treadmill protocol (20 min running session each day for 2 weeks). All animals ran at 60% of their maximal oxygen uptake (VO_{2max}), which was measured indirectly prior to training [34,36]. Animals in the SED group were daily placed on the treadmill for 5 min without any stimulus to run. Gentle tapping on their back encouraged rats that initially refused to run. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study, and the treadmill exercise was performed between 2:00 and 5:00 PM

2.3. Inhibitory avoidance test

Single-trial step-down inhibitory avoidance conditioning was used as an established model of fear-motivated memory where the animals learned to associate a location in the training apparatus (a grid floor) with an aversive stimulus (foot shock). In the training session, the rats received a 0.6 mA foot shock for 3.0 s. The test session was performed 24 h after a single training session to evaluate long-term memory; no foot shock was delivered, and the step-down latency (maximum 180 s) was used as memory retention [38]. The behavioral test was conducted 30 min after the last exercise training and 30 min prior to euthanasia. Previously, we described a transitory treadmill exercise effects on aversive memory [33,34]. After behavioral test rats were randomly subdivided into 1 and 18 h groups in order to verify transitory and delayed exercise effects on biochemical outcomes (Fig. 1).

2.4. Sample preparation

Rats were decapitated 1 and 18 h after the last exercise training session, consequently 30 min or 17.5 h respectively, after behavioral measurement (Fig. 1). It is important to cite that 1 h after exercise was performed in the afternoon while 18 h was taken early in the morning. Each exercised group had its sedentary control group. The hippocampi and prefrontal cortices were quickly dissected, immediately snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

2.5. β -secretase (BACE) activity

BACE activity was evaluated using a commercially available kit (Abcam, catalog number ab65357) according to the manufacturer's instructions. The hippocampus and prefrontal cortices ($n=5–9$) were homogenized, incubated on ice for 10 min and centrifuged $10.000 \times g$ for 5 min at 4 °C; thereafter, the supernatant was collected. In a black 96-wells plate, 30 μ L of the sample (total protein

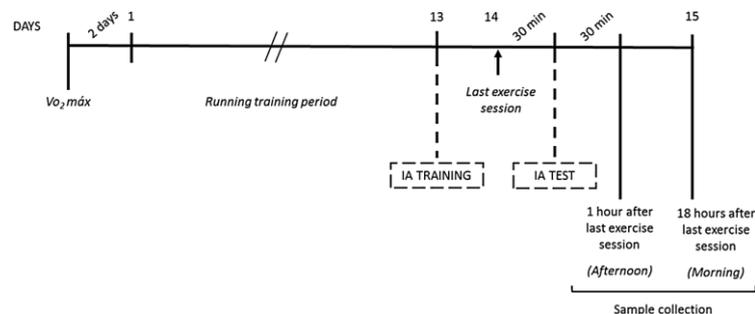


Fig. 1. Schematic diagram showing experiment design used in this study. The horizontal line represents the timeline of exercise protocol (14 days), inhibitory avoidance (IA), training and test, and sample collection. Exercised groups were subjected to a moderate daily treadmill protocol (20 min running session each day for 14 days). All animals were submitted to IA training trial and 24 h later IA test (30 min after the last exercise session). Samples collection was performed 1 h (afternoon) or 18 h (morning) after the last exercise session.

~200 μg) was added to each well followed by 70 μL of $2 \times$ reaction buffer and 2 μL of the BACE substrate. The plate was incubated in the dark at 37°C for 1 h. Fluorescence was read at excitation and emission wavelengths of 345 and 520 nm, respectively. BACE activity was expressed as relative fluorescence units (RFU) per mg of protein.

2.6. α -secretase (TACE) activity

TACE Activity Fluorimetric Assay Kit was used according to the manufacturer's instructions (Anaspec Inc. catalog number 72085). The hippocampus and prefrontal cortex ($n=5-9$) were homogenized in assay buffer containing 0.1% Triton-X 100, incubated for 15 min at 4°C and centrifuged at $2,000 \times g$ at 4°C , after which the supernatant was collected. In a 96-wells plate, 50 μL of the sample (total protein ~400 μg) was added into each well followed by 50 μL of the TACE substrate solution, after the reagents were mixed completely by an orbital shaker for 30 s. The plate was incubated in the dark for 1 h, after which 50 μL of stop solution was added, and the fluorescence was read at excitation (490 nm) and emission (520 nm) wavelengths. TACE activity was expressed as relative fluorescence units (RFU) per mg of protein.

2.7. Western blot analysis

Western blot was performed to evaluate the hippocampal APP content. The hippocampus ($n=4$ animals per group) was homogenized with RIPA buffer (1:10) with phosphatase and protease inhibitors cocktails (1:100, Sigma Aldrich, Missouri, USA). Proteins were separated by 10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 1.5 mm, 120 V) and transferred to PVDF membranes (Millipore). The membrane was blocked for 1 h with 4% nonfat dry milk in TBS-T and then blotted with primary antibodies anti-APP (Millipore, 1:5000) and GAPDH (Cell Signaling, 1:5000) overnight at 4°C and a secondary horseradish peroxidase anti-rabbit antibody (Cell Signaling, 1:1000) for 2 h at room temperature. The proteins were quantified by measuring the band intensity (area \times OD) using the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) and normalizing to GAPDH.

2.8. Protein quantification

The total protein was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard [39].

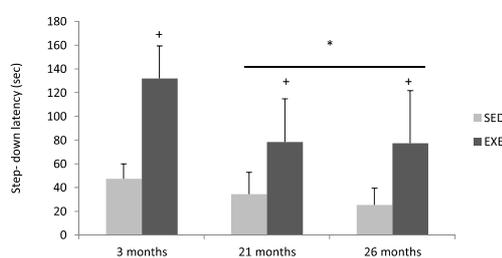


Fig. 2. Effects of aging and treadmill exercise on step-down latency in the inhibitory avoidance test. Three month-old SED ($n=20$) and EXE ($n=18$); 21 month-old SED ($n=13$) and EXE ($n=14$); 26 month-old SED and EXE ($n=12$). The columns represent the mean \pm SD; two-way ANOVA followed by Tukey's test. * Values significantly different from 3-month-old groups ($p < 0.05$). * Values significantly different from its respective sedentary control group ($p < 0.05$).

2.9. Statistical analysis

Behavioral data and secretase activities results were expressed as the mean \pm SD and were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) with age and exercise as factors followed by Tukey post hoc test. Taken that APP content was non-parametric data it was employed Kruskal–Wallis. In all tests the accepted significance level was $p < 0.05$.

3. Results

In the inhibitory avoidance test two-way ANOVA showed an effect of both factors, age ($F_{(2,88)} = 22.172$; $p < 0.001$) and exercise ($F_{(1,88)} = 122.751$; $p < 0.001$). Aged rats exhibited impaired aversive memory performance compared to young adult rats; however, daily moderate exercise increased the step-down latency in all groups ($p < 0.05$; Fig. 2).

Two-way ANOVA showed a significant age effect on hippocampal TACE activity in 1 h groups ($F_{(2,40)} = 24.080$; $p < 0.001$; Fig. 3A) as well as 18 h groups ($F_{(2,36)} = 46.280$; $p < 0.001$; Fig. 3B) since 26-month-old rats showed decreased TACE activity compared to other ages in both tested time points (Tukey post hoc test; $p < 0.001$). Neither exercise nor aging process induced changes on hippocampal BACE activity (Fig. 4A and B). It is important to note that a similar profile of tested time points, 1 and 18 h groups was observed in hippocampal secretase activities.

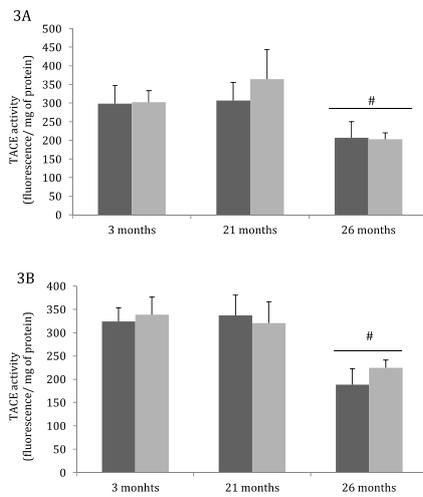


Fig. 3. Effects of aging and treadmill exercise on the hippocampal TACE activity in both tested time points. (Panel A) 1 h groups; 3 month-old SED (n = 6) and EXE (n = 9); 21 month-old SED and EXE (n = 7); 26 month-old SED and EXE (n = 6); (Panel B) 18 h groups; 3 month-old SED and EXE (n = 7); 21 month-old SED (n = 6) and EXE (n = 7); 26 month-old SED and EXE (n = 5). The columns represent the mean \pm SD; two-way ANOVA followed by Tukey's test. #Values significantly different from 3- and 21-month-old groups ($p < 0.05$).

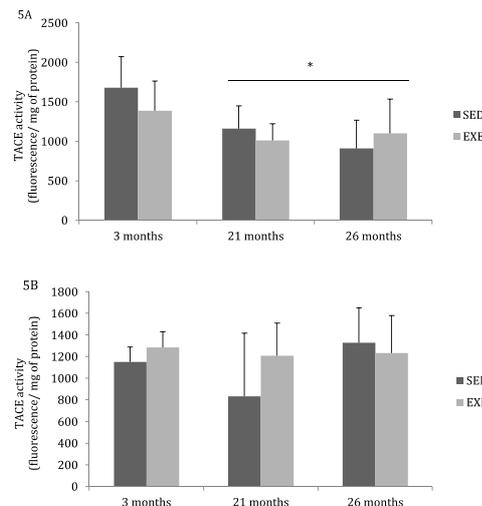


Fig. 5. Effects of aging and treadmill exercise on cortical TACE activity in both tested time points. (Panel A) 1 h groups; 3 month-old SED (n = 7) and EXE (n = 8); 21 month-old SED (n = 7) and EXE (n = 6); 26 month-old SED and EXE (n = 7). (Panel B) 18 h groups; 3 month-old SED (n = 7) and EXE (n = 9); 21 month-old SED and EXE (n = 7); 26 month-old SED and EXE (n = 7). The columns represent the mean \pm SD; two-way ANOVA followed by Tukey's test. *Values significantly different from 3-month-old groups ($p < 0.05$).

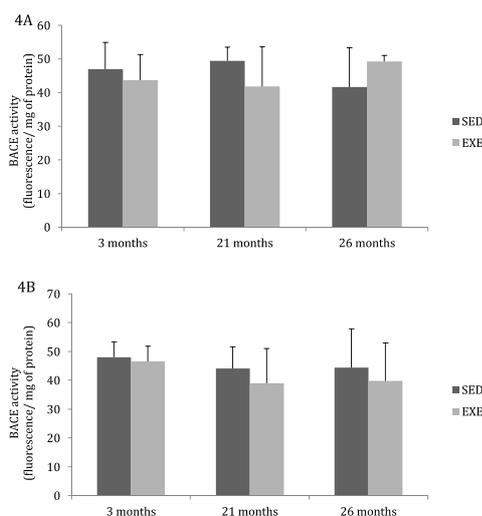


Fig. 4. Effects of aging and treadmill exercise on the hippocampal BACE activity in both tested time points. (Panel A) 1 h groups; 3 month-old SED (n = 9) and EXE (n = 6); 21 month-old SED (n = 6) and EXE (n = 7); 26 month-old SED and EXE (n = 5). (Panel B) 18 h groups; 3 month-old SED (n = 6) and EXE (n = 9); 21 month-old SED (n = 5) and EXE (n = 6); 26 month-old SED and EXE (n = 5). The columns represent the mean \pm SD; two-way ANOVA followed by Tukey's test.

In contrast, a significant aging process effect was observed on TACE activity in the prefrontal cortex in 1 h groups ($F_{(2,41)} = 10.075$; $p < 0.001$; Fig. 5A), given that there was a decreased TACE activity in both aged groups, 21 and 26-month-old rats compared to young adult ones (Tukey post hoc test; $p = 0.004$ and $p = 0.001$, respectively). However, this profile was not observed in prefrontal cortex collected in the early morning (18 h groups, Fig. 5B) demonstrating a clear temporal profile.

Besides, cortical BACE activity was significantly higher in 26 month-old rats in afternoon (1 h groups) than in other tested ages ($F_{(2,42)} = 4.580$; $p = 0.017$; Fig. 6A) corroborating the results observed with cortical TACE activity there were no changes in BACE activity in the early morning (18 h groups, Fig. 6B).

Our exercise protocol was unable to impact amyloidogenic and non-amyloidogenic pathways, specifically cortical and hippocampal BACE and TACE activities neither transiently nor delayed, respectively 1 or 18 h after the last exercise session.

Additionally, the ratio between TACE and BACE activities was evaluated showing a significant age effect in the afternoon groups (1 h) in hippocampi ($F_{(2,43)} = 4.845$; $p = 0.013$; Fig. 7A). Hippocampal TACE/BACE ratio was decreased in 26-month-old rats compared to other ages (Tukey post hoc test; $p = 0.012$), however this ratio remained unchanged in 18 h groups (Fig. 7B).

In accordance with the results described above a significant age effect was observed in cortical TACE/BACE ratio ($F_{(2,40)} = 10.494$; $p < 0.001$; Fig. 8A), since it was showed a decreased TACE/BACE ratio in both aged groups (Tukey post hoc test; $p = 0.001$); interestingly this profile was not observed in samples collected in early morning (18 h groups, Fig. 8B).

In addition, APP content ($KW = 2.33$; $p = 0.8019$) remained unchanged in all groups (data not shown).

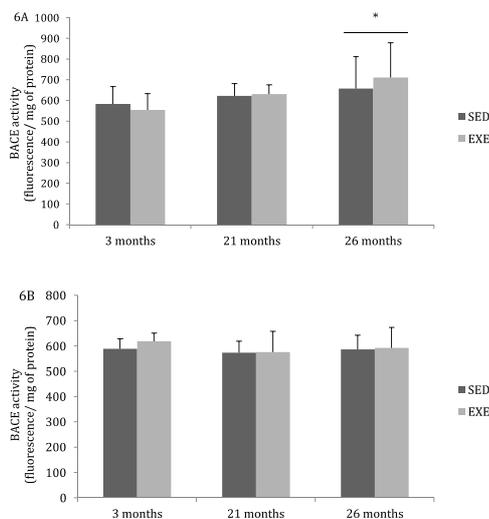


Fig. 6. Effects of aging and treadmill exercise on cortical BACE activity in both tested time points. (Panel A) 1 h groups; 3 month-old SED (n = 9) and EXE (n = 8); 21 month-old SED and EXE (n = 7); 26 month-old SED and EXE (n = 6). (Panel B) 18 h groups; 3 month-old SED (n = 6) and EXE (n = 8); 21 month-old SED (n = 6) and EXE (n = 5); 26 month-old SED and EXE (n = 6). The columns represent the mean \pm SD; two-way ANOVA followed by Tukey's test. *Values significantly different from 3-month-old groups ($p < 0.05$).

4. Discussion

Our work adds evidence for the role of non-amyloidogenic and amyloidogenic pathways, specifically of secretases in the aging process. In addition, to our knowledge, this is the first study evaluating TACE activity in healthy aged brains. In this context, we observed a diminished α -secretase activity, specifically TACE (ADAM17). Consistent with our results, lower soluble APP α (sAPP α) levels, a TACE-derived product, have been found in cerebrospinal fluid (CSF) of 23-month-old rats [19]. Moreover, individuals with Alzheimer's disease present low sAPP α levels in the CSF suggesting reduced TACE-dependent α -secretase activity [40,41]. Taken that sAPP α appears to have beneficial functions including neuroprotection, neurotrophism and neurogenesis [19,42], it is possible to suppose that reduced TACE activity observed here in aged prefrontal cortices and hippocampus might be implicated in their susceptibility to neurodegenerative disorders.

We can suggest that the memory impairment in aged rats, as evaluated by an inhibitory avoidance test, may be related to cortical TACE activity, since this parameter was reduced in prefrontal cortices of 21- and 26-month-old rats while in hippocampus this reduction was observed only in oldest rats (26-month-old rats). In accordance, Anderson et al. [19] showed the involvement of sAPP α levels in the cerebrospinal fluid (CSF) with better spatial cognitive performance in aged rats. Our data support the idea that decreases in cortical α -secretase (TACE)-mediated cleavage of APP, a non-amyloidogenic pathway, may be partly involved in the aging-related aversive memory decline.

In addition to its role on APP processing, TACE can regulate the inflammatory processes through TNF- α cleavage of its membrane-bound form [43–45]. Interestingly several studies have demonstrated that memory performance can be related to TNF- α ,

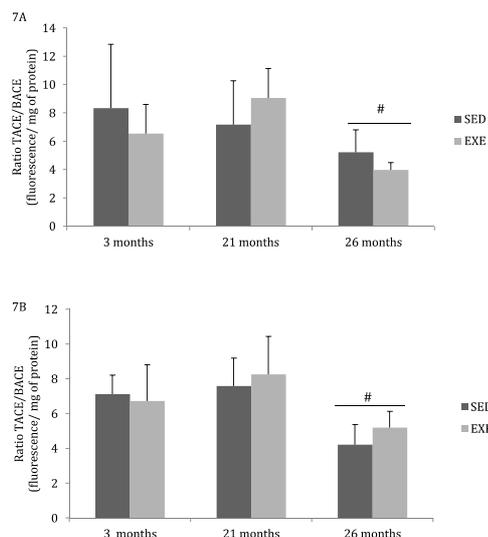


Fig. 7. Effects of aging and treadmill exercise on hippocampal TACE/BACE ratio in both tested time points. (Panel A) 1 h groups; 3 month-old SED and EXE (n = 9); 21 month-old SED and EXE (n = 7); 26 month-old SED and EXE (n = 6). (Panel B) 18 h groups; 3 month-old SED (n = 7) and EXE (n = 9); 21 month-old SED and EXE (n = 5); 26 month-old SED and EXE (n = 6). The columns represent the mean \pm SD; two-way ANOVA followed by Tukey's test. #Values significantly different from 3- and 21-month-old groups ($p < 0.05$).

however, these studies are contradictory. Fiore et al. [46] observed that transgenic mice overexpressing TNF- α showed impaired inhibitory avoidance performance. In contrast, it has been suggested that TNF- α is essential for memory function in healthy aging, since mice deficient for TNF- α under non-inflammatory conditions have poor memory [47,48]. Our group did not show any correlation between TNF- α and the aversive memory performance in healthy aged rats [34]. Taken together, it is reasonable to speculate that different mechanisms related to TNF- α , such as TACE activity, can actually modulate the memory performance.

The amyloidogenic pathway represented by BACE activity was also investigated. Although rodents are widely used as aging model, little is known about the impact of healthy aging process on BACE activity in rats. In the present work, it was observed an augmented BACE activity in the oldest-old cortices (26-month-old); therefore, we can propose that Wistar rats are good animal models for human brain aging. In accordance, the BACE activity was increased in cortex of aged rats compared to young ones (4–6 months) [49]. Moreover, Fukumoto et al. [50] demonstrated a higher BACE activity in aged cortices and cerebellum of human, monkey and Tg2576 transgenic mice. Takahashi et al. [10] described increased A β 1–42 levels in brains of 26-month-old healthy rats. These findings can be related to the higher cortical vulnerability to neurodegenerative disorders, especially AD. An interesting result that emerges from this work was related to TACE/BACE imbalance in favor of BACE activity in aged brain, specifically hippocampus and cortex. These findings may be implicated with age-related susceptibility to neurodegenerative disorders and could reflect a cellular environment that facilitates A β peptide production and consequently brain senile plaque formation. In addition, the aging-induced disruption of this balance was structure-dependent, since an imbalance was found

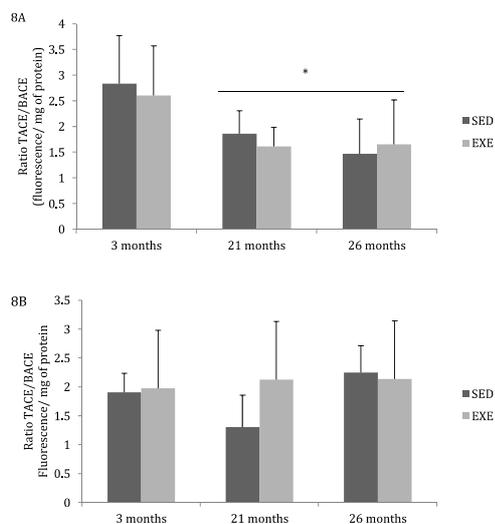


Fig. 8. Effects of aging and treadmill exercise on cortical TACE/BACE ratio in both tested time points. (Panel A) 1 h groups; 3 month-old SED (n = 7) and EXE (n = 8); 21 month-old SED and EXE (n = 7); 26 month-old SED and EXE (n = 6). (Panel B) 18 h groups; 3 month-old SED (n = 8) and EXE (n = 9); 21 month-old SED (n = 5) and EXE (n = 7); 26 month-old SED and EXE (n = 4). The columns represent the mean \pm SD; two-way ANOVA followed by Tukey's test. *Values significantly different from 3-month-old groups ($p < 0.05$).

in cortices of 21- and 26-month-old rats while in the hippocampus was observed only in oldest rats. Our findings can support pharmacological BACE inhibition as a potential neuroprotective strategy; however, the efficacy profile might depend on brain structure and age-tested.

Even that a higher BACE activity was found in aged cortices, we cannot exclude other potential mechanisms involved in brain aging, since BACE-independent pathways, such as cathepsins have been described [51,52]. In addition, several processes can change the total A β levels in brain regions, such as A β oligomerization, deposition and clearance [50,53,54]. Interestingly, a decreased A β clearance has been suggested as a central mechanism in AD. Mawuenyega et al. [55] showed that the production rates of A β 1–40 and A β 1–42 were similar between individuals with symptomatic AD and age-matched cognitively normal controls while the A β clearance rates were decreased in AD patients. Taken together, it is possible to infer that reduced A β clearance can be linked to neurodegeneration in AD while non-amyloidogenic and amyloidogenic pathways, specifically of secretases, could be associated with age-related susceptibility to neurodegenerative disorders.

An important finding that emerges from this work is that secretase activities in prefrontal cortices can be modulated by the circadian rhythm in aging process. It was observed a clear temporal profile in the secretase activities in prefrontal cortices since both BACE and TACE activities were changed only in the afternoon period. On the other hand, hippocampal secretase activities were altered in both tested time points. Therefore, it is possible speculate that distinct brain areas may respond differently to circadian rhythm influence. Taken that melatonin is able to upregulate the TACE enzyme [56] and melatonin is strongly decreased with age [57] we can infer that decreased levels of melatonin are related to lesser TACE activity in cortices of aged animals. It is possible to rec-

ognize that BACE activity was increased in cortices of oldest rats in the afternoon period. Impaired rest-activity rhythms are found in AD patients as well in experimental AD model mice [58–60]. Interestingly, Blake et al. [61] using *Drosophila* model have showed that increased BACE expression is able to impair rest-activity rhythms especially in aged animals with a mechanism independent of A β production. Our data obtained with brain rodent can be related to disruption of circadian rest/activity rhythmicity present during normal aging [62,63], giving insights and might open new avenues for further studies regarding the modulation of secretase activities by circadian rhythms in aging process. Besides, taken that BACE inhibitors have been considered a promising target for AD treatment [1,10], it is possible infer that the *in vivo* studies of BACE inhibitors should observe times/time of day of administration. Our results might propose that the appropriate time of day for BACE inhibitors administration is afternoon in rodent models.

Another remarkable point for discussion is that our neuroprotective exercise protocol, daily running during two weeks, was unable to modulate BACE and TACE activities in prefrontal cortices and hippocampi of Wistar rats in both evaluated time points after exercise. Consequently, neither transitory nor delayed effects of our exercise protocol were observed in all tested ages. It was demonstrated that this exercise protocol transiently improved aversive memory performance in young adult and aged rats concomitantly reduced hippocampal pro-inflammatory cytokines levels of aged rats, while was able to increase anti-inflammatory cytokines in young adult rats, showing a biochemical age-dependent profile [34]. Besides, our group has suggested that exercise can impact different biochemical marks in an age-dependent manner, since lower levels of histone H4 acetylation were transiently reversed in hippocampi of aged rats, without any effect in young ones [34]. Taken together, we can suggest that exercise-induced improvements in cognitive performance were independent of non-amyloidogenic and amyloidogenic pathways, as well it is impossible to exclude that different cellular mechanisms are involved.

Although we did not observe any transient or delayed effects of this exercise protocol it is impossible to exclude that a long-term exercise protocol could impact non-amyloidogenic and amyloidogenic pathways. Recently Sinha et al. [49] reported that a long-term dietary supplementation during 18 months with antioxidants, a combination of *N*-acetylcysteine, α -lipoic and α -tocopherol, reversed the age-related alterations in amyloid beta metabolism in cortices of rats.

The aging process and the exercise protocol were unable to alter the hippocampal APP protein levels. Our results are consistent with those obtained by Solas [64] and Anderson et al. [19] with 18- and 23-month-old rats, respectively. Although Sinha et al. [49] described that both mRNA expression and protein levels of APP were increased in the cortex of aged rats; Flood et al. [65] showed that cortical APP mRNA levels remained unchanged during aging. Additionally, a recent study showed that the hippocampal APP levels of 4-month-old APP/PS1 mice were unaltered after ten weeks of treadmill training [66].

In conclusion, our data suggest that the reduced cortical TACE activity can be linked at least in part to aging-related aversive memory decline. In addition, the imbalance of non-amyloidogenic and amyloidogenic pathways can contribute to hippocampal and cortical susceptibility to neurodegenerative disorders. Furthermore, neither transitory nor delayed effects of a daily moderate exercise protocol during 2 weeks on non-amyloidogenic and amyloidogenic pathways were observed.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported, in part, by grant 476634/2013-0 from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq/Brazil. CNPq fellowships (Dr. I.R. Siqueira; L.R. Cechinel; C. Basso; K. Bertoldi; L.C. Meireles); Programa de Bolsas de Iniciação Científica – UFRGS/CNPq (B. Schallenger).

References

- [1] C. Ballard, S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, E. Jones, Alzheimer's disease, *Lancet* 2377 (9770) (2011) 1019–1031.
- [2] I. Driscoll, D.A. Hamilton, H. Petropoulos, R.A. Yeo, W.M. Brooks, R.N. Baumgartner, R.J. Sutherland, The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings, *Cereb. Cortex* 13 (12) (2003) 1344–1351.
- [3] B.A. Yankner, T. Lu, P. Loerch, The aging brain, *Annu. Rev. Mech. Dis.* 3 (2008) 41–66.
- [4] C.A. McLean, R.A. Cherny, F.W. Fraser, J. Fuller, M.J. Smith, K. Beyreuther, A.I. Bush, C.L. Masters, Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.* 46 (1999) 860–866.
- [5] J.L. Price, The relationship between tangle and plaque formation during healthy aging and mild dementia, *Neurobiol. Aging* 14 (1993) 661–663.
- [6] D.M. Walsh, I. Klyubin, J.V. Fadeeva, W.K. Cullen, R. Anwyl, M.S. Wolfe, M.J. Rowan, D.J. Selkoe, Naturally secreted oligomers of amyloid [beta] protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo, *Nature* 416 (2002) 535–539.
- [7] D.S. Knopman, J.E. Parisi, A. Salvati, M. Floriach-Robert, B.F. Boeve, R.J. Ivnik, G.E. Smith, D.W. Dickson, K.A. Johnson, L.E. Petersen, W.C. McDonald, H. Braak, R.C. Petersen, Neuropathology of cognitively normal elderly, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 11 (2003) 1087–1095.
- [8] J.L. Price, D.W. McKeel Jr, V.D. Buckles, C.M. Roe, C. Xiong, M. Grundman, L.A. Hansen, R.C. Petersen, J.E. Parisi, D.W. Dickson, C.D. Smith, D.G. Davis, F.A. Schmitt, W.R. Markesbery, J. Kaye, R. Kurlan, C. Hulette, B.F. Kurland, R. Higdon, W. Kukull, J.C. Morris, Neuropathology of non demented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease, *Neurobiol. Aging* 30 (2009) 1026–1036.
- [9] V. Chow, M. Mattson, P. Wong, M. Gleichmann, An overview of APP processing enzymes and products, *Neuromol. Med.* 12 (2010) 1–12.
- [10] H. Takahashi, H. Fukumoto, R. Maeda, J. Terauchi, K. Kato, M. Miyamoto, Ameliorative effects of a non-competitive BACE1 inhibitor TAK-070 on Aβ peptide levels and impaired learning behavior in aged rats, *Brain Res.* 1361 (2010) 146–156.
- [11] M. Sastre, J. Walter, S. Gentleman, Interactions between APP secretases and inflammatory mediators, *J. Neuroinflamm.* 5 (2008) 25.
- [12] S. Lesné, M.T. Koh, L. Kotilinek, R. Kaye, C.G. Glabe, A. Yang, M. Gallagher, K.H. Ashe, A specific amyloid-β protein assembly in the brain impairs memory, *Nature* 440 (7082) (2006) 352–357.
- [13] J.E. Morley, S.A. Farr, The role of amyloid-beta in the regulation of memory, *Biochem. Pharmacol.* 88 (4) (2014) 479–485.
- [14] E. Mura, S. Zappettini, S. Preda, F. Biundo, C. Lanni, M. Grilli, A. Cavallero, G. Olivero, A. Salamone, S. Govoni, M. Marchi, Dual effect of beta-amyloid on α7 and α4β2 nicotinic receptors controlling the release of glutamate, aspartate and GABA in rat hippocampus, *PLoS One* 7 (1) (2012) e29661.
- [15] H. Oh, E.C. Mormino, C. Madison, A. Hayenga, A. Smiljic, W.J. Jagust, β-Amyloid affects frontal and posterior brain networks in normal aging, *Neuroimage* 54 (3) (2011) 1887–1895.
- [16] H.J. Aizenstein, R.D. Nebes, J.A. Saxton, J.C. Price, C.A. Mathis, N.D. Tsopelas, S.K. Zolko, J.A. James, B.E. Snitz, P.R. Houck, W. Bi, A.D. Cohen, B.J. Lopresti, S.T. Dekosky, E.M. Halligan, W.E. Klunk, Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly, *Arch. Neurol.* 65 (2008) 1509–1517.
- [17] Y. Tachida, K. Nakagawa, T. Saito, T.C. Saido, T. Honda, Y. Saito, M. Murayama, T. Endo, G. Sakaguchi, A. Kato, S. Kitazume, Y. Hashimoto, Interleukin-1β up-regulates TACE to enhance α-cleavage of APP in neurons: resulting decrease in Aβ production, *J. Neurochem.* 104 (2008) 1387–1393.
- [18] P.R. Turner, K. O'Connor, W.P. Tate, W.C. Abraham, Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory, *Prog. Neurobiol.* 70 (1) (2003) 1–32.
- [19] J.J. Anderson, G. Holtz, P.P. Baskin, R. Wang, L. Mazzarelli, S.L. Wagner, F. Menzaghi, Reduced cerebrospinal fluid levels of α-secretase-cleaved amyloid precursor protein in aged rats: correlation with spatial memory deficits, *Neuroscience* 93 (1999) 1409–1420.
- [20] M. Sánchez-Alavez, S.L. Chan, M.P. Mattson, J.R. Criado, Electrophysiological and cerebrovascular effects of the α-secretase-derived form of amyloid precursor protein in young and middle-aged rats, *Brain Res.* 1131 (2007) 112–117.
- [21] N.C. Berchtold, G. Chinn, M. Chou, J.P. Kesslak, C.W. Cotman, Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus, *Neuroscience* 133 (2005) 853–861.
- [22] S.E. Kim, I.G. Ko, B.K. Kim, M.S. Shin, S. Cho, C.J. Kim, S.H. Kim, S.S. Baek, E.K. Lee, Y.S. Jee, Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus, *Exp. Gerontol.* 45 (2010) 357–365.
- [23] H. Van Praag, T. Shubert, C. Ahaio, F. Gage, Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice, *J. Neurosci.* 25 (2005) 8680–8685.
- [24] S. Wang, L. Chen, L. Zhang, C. Huang, Y. Xiu, F. Wang, Y. Tang, C. Zhou, Y. Luo, Q. Xiao, Y. Tang, Effects of long-term exercise on spatial learning memory ability, and cortical capillaries in aged rats, *Med. Sci. Monit.* 21 (2015) 945–954.
- [25] P.A. Adlard, V.M. Perreau, V. Pop, C.W. Cotman, Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.* 25 (2005) 4217–4221.
- [26] D.S. Albeck, K. Sano, G.E. Prewitt, L. Dalton, Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat, *Behav. Brain Res.* 168 (2006) 345–348.
- [27] S. Di Loreto, S. Falone, A. D'Alessandro, S. Santini Jr, P. Sebastiani, M. Cacchio, F. Amicarelli, Regular and moderate exercise initiated in middle age prevents age-related amyloidogenesis and preserves synaptic and neuroprotective signaling in mouse brain cortex, *Exp. Gerontol.* 57 (2014) 57–65.
- [28] H.L. Liu, G. Zhao, H. Zhang, Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice, *Behav. Brain Res.* 256 (2013) 261–272.
- [29] Z.-Q. Xu, L.-Q. Zhang, Q. Wang, C. Marshall, N. Xiao, J.-Y. Gao, T. Wu, J. Ding, G. Hu, M. Xiao, Aerobic exercise combined with antioxidant treatment does not counteract moderate- or mid-stage alzheimer-like pathophysiology of APP/PS1 mice, *CNS Neurosci. Ther.* 19 (2013) 795–803.
- [30] G. Zhao, H.L. Liu, H. Zhang, X.J. Tong, Treadmill exercise enhances synaptic plasticity, but does not alter β-amyloid deposition in hippocampus of aged APP/PS1 transgenic mice, *Neuroscience* 298 (2015) 357–366.
- [31] S.K. Rao, J.M. Ross, F.E. Harrison, A. Bernardo, R.S. Reiserer, R.S. Reiserer, J.A. Mobley, M.P. McDonald, Differential proteomic and behavioral effects of long-term voluntary exercise in wild-type and APP-overexpressing transgenics, *Neurobiol. Dis.* 78 (2015) 45–55.
- [32] D. Scopel, C. Fochesatto, H. Cimarosti, M. Rabbo, A. Belló-Klein, C. Salbego, C.A. Netto, I.R. Siqueira, Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation, *Brain Res. Bull.* 71 (2006) 155–159.
- [33] G.A. Lovatel, K. Bertoldi, V.R. Elsner, C. Vanzella, F.d.S. Moysés, C. Spindler, V.R. Funck, L.M. Pereira, C.V. de Oliveira, M.S. Oliveira, C.A. Netto, I.R. Siqueira, Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function, *Neurobiol. Learn. Mem.* 98 (2012) 182–187.
- [34] G.A. Lovatel, V.R. Elsner, K. Bertoldi, C. Vanzella, F.S. Moysés, A. Vizuete, C. Spindler, L.R. Cechinel, C.A. Netto, A.R. Muotri, I.R. Siqueira, Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus, *Neurobiol. Learn. Mem.* 101 (2013) 94–102.
- [35] V.R. Elsner, G.A. Lovatel, K. Bertoldi, C. Vanzella, F.M. Santos, C. Spindler, E.F. de Almeida, P. Nardin, I.R. Siqueira, Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus, *Neuroscience* 192 (2011) 580–587.
- [36] V.R. Elsner, G.A. Lovatel, F. Moysés, K. Bertoldi, C. Spindler, L.R. Cechinel, A.R. Muotri, I.R. Siqueira, Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study, *Exp. Gerontol.* 48 (2013) 136–139.
- [37] C. Spindler, L.R. Cechinel, C. Basso, F. Moysés, K. Bertoldi, R. Roesler, G.A. Lovatel, E.V. Rostrirola, I.R. Siqueira, Treadmill exercise alters histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in frontal cortices from Wistar rats, *Cel. Mol. Neurobiol.* 34 (8) (2014) 1097–1101.
- [38] O.B. Amaral, T. Luff, M. Cammarota, I. Izquierdo, R. Roesler, Temporary inactivation of the dorsal hippocampus induces a transient impairment in retrieval of aversive memory, *Behav. Brain Res.* 180 (2007) 113–118.
- [39] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [40] K. Sennvik, J. Fastbom, M. Blomberg, L.O. Wahlund, E. Benedikz, Levels of α- and β-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients, *Neurosci. Lett.* 278 (3) (2000) 169–172.
- [41] M. Pietri, C. Dakowski, S. Hannaoui, A. Alleaume-Butaux, J. Hernandez-Rapp, A. Ragagnin, S. Mouillet-Richard, S. Haik, Y. Bailly, J.M. Peyrin, J.M. Launay, O. Kellermann, B. Schneider, PDK1 decreases TACE-mediated [alpha]-secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases, *Nat. Med.* 19 (9) (2013) 1124–1131.
- [42] A.M. Claassen, D. Guévremont, S.E. Mason-Parker, K. Bourne, W.P. Tate, W.C. Abraham, J.M. Williams, Secreted amyloid precursor protein-α upregulates synaptic protein synthesis by a protein kinase G-dependent mechanism, *Neurosci. Lett.* 460 (2009) 92–96.
- [43] R.A. Black, C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, D.P. Cerretti, A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-α from cells, *Nature* 385 (1997) 729–733.
- [44] M.L. Kim, B. Zhang, I.P. Mills, M.E. Milla, K.R. Brunden, V.M. Lee, Effects of TNFα-converting enzyme inhibition on amyloid beta production and APP processing in vitro and in vivo, *J. Neurosci.* 28 (2008) 12052–12061.
- [45] M. Blacker, M.C. Noe, T.J. Carty, C.G. Goodyer, A.C. LeBlanc, Effect of tumor necrosis factor-α converting enzyme (TACE) and metalloprotease inhibitor on amyloid precursor protein metabolism in human neurons, *J. Neurochem.* 83 (2002) 1349–1357.

- [46] M. Fiore, L. Probert, G. Kollias, K. Akassoglou, E. Alleva, L. Aloe, Neurobehavioral alterations in developing transgenic mice expressing TNF- α in the brain, *Brain, Behav. Immun.* 10 (1996) 126–138.
- [47] B.T. Baune, G. Ponath, J. Colledge, G. Varga, V. Arolt, M. Rothermundt, K. Berger, Association between IL-8 cytokine and cognitive performance in an elderly general population—the MEMO-study, *Neurobiol. Aging* 29 (2008) 937–944.
- [48] B.T. Baune, G. Ponath, M. Rothermundt, O. Riess, H. Funke, K. Berger, Association between genetic variants of IL-1 β , IL-6 and TNF- α cytokines and cognitive performance in the elderly general population of the MEMO-study, *Psychoneuroendocrinology* 33 (2008) 68–76.
- [49] M. Sinha, A. Bir, A. Banerjee, P. Bhowmick, S. Chakrabarti, Multiple mechanisms of age-dependent accumulation of amyloid beta protein in rat brain: prevention by dietary supplementation with *N*-acetylcysteine, α -lipoic acid and α -tocopherol, *Neurochem. Int.* 95 (2016) 92–99.
- [50] H. Fukumoto, D.L. Rosene, M.B. Moss, S. Raju, B.T. Hyman, M.C. Irizarry, β -Secretase activity increases with aging in human monkey, and mouse brain, *Am. J. Pathol.* 164 (2004) 719–725.
- [51] V. Hook, I. Schechter, H.-U. Demuth, G. Hook, Alternative pathways for production of β -amyloid peptides of Alzheimer's disease, *J. Biol. Chem.* 389 (2008) 993–1006.
- [52] V. Hook, T. Toneff, M. Bogyo, D. Greenbaum, F. Medzihradsky Katalin, J. Neveu, W. Lane, G. Hook, T. Reisine, Inhibition of cathepsin B reduces β -amyloid production in regulated secretory vesicles of neuronal chromaffin cells: evidence for cathepsin B as a candidate β -secretase of Alzheimer's disease, *J. Biol. Chem.* 386 (2005) 931–940.
- [53] N. Iwata, Y. Takaki, S. Fukami, S. Tsubuki, T.C. Saido, Region-specific reduction of A β -degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging, *J. Neurosci. Res.* 70 (2002) 493–500.
- [54] M.A. Leissring, W. Farris, A.Y. Chang, D.M. Walsh, X. Wu, X. Sun, M.P. Frosch, D.J. Selkoe, Enhanced proteolysis of β -Amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation secondary pathology, and premature death, *Neuron* 40 (2003) 1087–1093.
- [55] K.G. Mawuenyega, W. Sigurdson, V. Ovod, L. Munsell, T. Kastan, J.C. Morris, K.E. Yarasheski, R.J. Bateman, Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease, *Science* 330 (6012) (2010) 1774.
- [56] M. Shukla, H.H. Htoo, P. Wintachai, J.F. Hernandez, C. Dubois, R. Postina, H. Xu, F. Checler, D.R. Smith, P. Govitrapong, B. Vincent, Melatonin stimulates the nonamyloidogenic processing of BAPP through the positive transcriptional regulation of ADAM10 and ADAM17, *J. Pineal Res.* 58 (2) (2015) 151–165.
- [57] F. Waldhauser, G. Weissenbacher, E. Tatzler, B. Gisinger, M. Waldhauser, M. Schemper, H. Frisch, Alterations in nocturnal serum melatonin levels in humans with growth and aging*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66 (3) (1988) 648–652.
- [58] D.G. Harper, et al., Disturbance of endogenous circadian rhythm in aging and Alzheimer disease, *Am. J. Geriatr. Psychiatr.* 13 (2005) 359–368.
- [59] Y.H. Wu, D.F. Swaab, Disturbance and strategies for reactivation of the circadian rhythm system in aging and Alzheimer's disease, *Sleep Med.* 8 (2007) 623–636.
- [60] J.H. Roh, et al., Disruption of the sleep–wake cycle and diurnal fluctuation of beta-amyloid in mice with Alzheimer's disease pathology, *Sci. Transl. Med.* 4 (2012) (150ra122).
- [61] M.R. Blake, S.D. Holbrook, J. Kotwica-Rolinska, E.S. Chow, D. Kretzschmar, J.M. Gieblutowicz, Manipulations of amyloid precursor protein cleavage disrupt the circadian clock in aging *Drosophila*, *Neurobiol. Dis.* 77 (2015) 117–126.
- [62] K. Hu, E.J. Van Someren, S.A. Shea, F.A. Scheer, Reduction of scale invariance of activity fluctuations with aging and Alzheimer's disease: involvement of the circadian pacemaker, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (8) (2009) 2490–2494.
- [63] A.M. Stranahan, Chronobiological approaches to Alzheimer's disease, *Curr. Alzheimer Res.* 9 (1) (2012) 93–98.
- [64] M. Solas, B. Aisa, M.C. Mugueta, J. Del Rio, R.M. Tordera, M.J. Ramirez, Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's disease, *Neuropsychopharmacology* 35 (2010) 1664–1673.
- [65] F.M. Flood, R.F. Cowburn, J.A. Johnston, Presenilin-1, amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 mRNA levels in human superior frontal cortex during aging, *Neurosci. Lett.* 235 (1997) 17–20.
- [66] T.-W. Lin, Y.-H. Shih, S.-J. Chen, C.-H. Lien, C.-Y. Chang, T.-Y. Huang, S.-H. Chen, C.J. Jen, Y.-M. Kuo, Running exercise delays neurodegeneration in amygdala and hippocampus of Alzheimer's disease (APP/PS1) transgenic mice, *Neurobiol. Learn. Mem.* 118 (2015) 189–197.

5.2 Artigo II

Aging process and exercise effects on circulating exosomes profile

Submetido para a Mechanisms of Ageing and Development

Assunto:Submission MAD_2016_47 received by Mechanisms of Ageing and Development
Data:2016-08-12 12:05
Remetente:Mechanisms of Ageing and Development
<EviseSupport@elsevier.com>
Para:ionara@ufrgs.br
Responder para:mechagedev@elsevier.com

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: MAD_2016_47

Title: Aging process and exercise effects on circulating exosomes profile
Journal: Mechanisms of Ageing and Development

Dear Dr. Siqueira,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Mechanisms of Ageing and Development. Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=MAD and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Mechanisms of Ageing and Development

Mechanisms of Ageing and Development

Aging process and exercise effects on circulating exosomes profile

Karine Bertoldi^a, Bruna Schallenberger^b, Laura Reck Cechinel^a, Samuel Davies^c, Irene Cledes Kulkamp Guerreiro^c, Ionara Rodrigues Siqueira^{*a, b}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: Ionara Rodrigues Siqueira, Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, sala 313, 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3308 3121; e-mail: ionara@ufrgs.br

Abstract

Exosomes are extracellular vesicles related to both physiological and pathological conditions. The aim of this study was to evaluate the aging process and the exercise effects on circulating exosomes profile. Wistar rats of 3-, 21- and 26-month-old were divided into exercised and sedentary groups. The exercise protocol consisted in a daily moderate treadmill exercise (20 min each day during 2 weeks). Samples were collected 1 hour and 18 hours after the last exercise session and circulating exosomes were obtained. CD63 levels and AChE activity were evaluated as exosomes markers. In addition, the quantification of reactive species content and SOD activity were performed, as well as A β levels. It was observed a decrease in CD63 levels and increases in the AChE activity and reactive species levels in circulating exosomes of aged rats compared to young ones. Delayed exercise effects were observed on peripheral exosomal, since CD63, reactive species contents and AChE activity were altered 18 hours after the last exercise. Our results suggest that the normal aging process can change circulating exosomal profile. Exercise-induced alterations of peripheral exosomes may be related to its beneficial effects in the aging process.

Keywords: circulating exosomes; aging; reactive species content; rats; treadmill exercise; acetylcholinesterase activity.

1. Introduction

Exosomes are small vesicles of endosomal origin released into extracellular space via exocytosis under normal or pathological conditions (Gupta & Pulliam 2014; Théry et al. 2009). Evidence suggests that exosomes may be found in several tissues and body fluids including brain, peripheral blood, urine and cerebrospinal fluid (CSF); in addition, they can carry several proteins, nucleic acids and lipids (Gupta & Pulliam 2014; Bellingham et al. 2012). Moreover, exosome membrane-specific proteins have been identified, for example tetraspanins such as CD63 and CD81 (Schorey & Bhatnagar 2008). Recently, studies have suggested that exosomes play an important role as intercellular communication by delivering functional proteins, mRNA and miRNAs among different cells (Bellingham et al. 2012; Lee et al. 2012). In this context, increasing attention has been given to its ability to transfer toxic proteins between cells, mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) in amyotrophic lateral sclerosis (Chivet et al. 2012), A β peptide in Alzheimer disease (AD) (Fiandaca et al. 2015) and several proteins related to tumor progression (Alegre et al. 2016).

Although the exosomes have been linked to age-related pathological conditions, such as neurodegenerative diseases (Fiandaca et al. 2015) and Lehmann and colleagues (2008) showed increases in exosome release in senescence model in vitro using human fibroblasts and prostate tumor cells, the involvement of these vesicles in normal aging process has been rarely addressed.

Interestingly, the imbalance between the reactive species generation and their removal by antioxidant defenses, including SOD activity, has been

considered as central in both healthy aging and age-related diseases (Halliwell, 1992; Siqueira et al., 2005). Recently, Fröhlich and colleagues (2014) showed an exchange of potential molecules, which can resist oxidative stress, specifically SOD and catalase, between oligodendrocytes and neurons through exosomes. Even though it was recognized that circulating exosomes are able to produce reactive species during pathological condition, specifically septic shock (Azevedo et al. 2007; Janiszewski et al. 2004), much remains unknown regarding the impact of aging process on exosomal reactive species and antioxidant enzymes.

The use of exosomes for prognostic and/or diagnostic in neurodegenerative diseases has been proposed. Fiandaca and colleagues (2015) suggested that A β levels in circulating exosomes are a potential biomarker of disease progression, since increased A β levels were detected in both preclinical and symptomatic AD patients with higher levels in symptomatic patients. Yet higher A β levels have been described in both brain (Knopman et al. 2003; Price et al. 2009) and plasma in normal aging process (Zou et al. 2010); to our knowledge, there are no reports evaluating the A β levels in circulating exosomes in different developmental stages.

A marked decrease of central cholinergic system, including AChE activity alterations, seems to have a central role in neurodegenerative processes and cognitive dysfunction in healthy aging process (Weinreb et al. 2015). Considering that Haider and colleagues (2014) observed a reduction in serum and brain AChE levels in aged rats, it is possible to suppose that aging process *per se* is able to alter serum-derived exosomal AChE levels. Since works have considered acetylcholinesterase (AChE) as a typical exosome enzyme (Perez-Gonzalez et al. 2012), its potential use as exosome biomarker must be tested in

aging conditions.

Evidences have demonstrated the beneficial effects of regular physical activity including in advanced age. Exercise is associated with increased longevity (Franco et al. 2015) and reduced risks of age-related diseases, such as cardiovascular diseases (Swift et al. 2013), cognitive impairment (Churchill et al. 2002) and AD (Lin et al. 2015). Frühbeis and colleagues (2015) observed an increased release of small extracellular vesicles into the circulation immediately after acute exercise in physically active healthy men. Despite these findings, to our knowledge, there are no reports evaluating the exercise impact on circulating exosomal profile in aging process. Although it is widely recognized that regular exercise improves age-related oxidative stress in several organs and tissues (Hammeren et al. 1992; Radák et al. 2001), there is a lack of studies reporting the relationship between exosomal oxidative status and exercise effects during aging process.

Our working hypothesis was that the aging process and exercise could alter circulating exosome profile. Therefore, the aim of this work was to evaluate transitory and delayed exercise effects, on serum exosome quantification through the CD63 and AChE activity in 3-, 21- and 26-month-old Wistar rats. Additionally, we also investigated the impact of aging process and exercise on exosomal oxidative status, such as reactive species levels and SOD activity, as well as the A β content.

2.Methods

2.1 Animals

Male Wistar rats of different ages, 3-month-old, 21-month-old and 26-month-old were used (n= 4-6). The choice of age groups was based on some previous works performed by our group demonstrating that this exercise protocol can modulate inflammatory, epigenetic and oxidative parameters in brain areas of young adult (3-month-old) and aged (20-21-month-old) rats (Cechetti et al. 2008; Elsner et al. 2013; Lovatel et al. 2013; Spindler et al., 2014). Additionally, the oldest-old age was chosen based on results describing increased A β 1-42 levels in brains of 26-month-old healthy rats (Takahashi et al., 2010). The animals were provided by the Centro de Reprodução Animal de Laboratório (CREAL) and maintained under standard conditions (12-h light/dark, 22 \pm 2 °C) with food and water *ad libitum*. The Local Ethics Committee (CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais – UFRGS; nr.23464) approved all animal procedures and experimental conditions.

2.2 Treadmill exercise

The animals were divided in sedentary (SED) or exercised groups (EXE). Exercise training consisted of running sessions on a motorized rodent treadmill (AVS Projetos, São Paulo, Brazil) using a moderate daily treadmill protocol (20 min running session each day for 2 weeks). All animals ran at 60% of their maximal oxygen uptake (VO₂), which was measured indirectly prior to training (Elsner et al. 2013; Lovatel et al. 2013). Previously, we demonstrated the neuroprotective effects of our treadmill exercise protocol (20 min/day during 2 weeks) since it is able to reduce *in vitro* ischemic damage in hippocampal slices of Wistar rats (Scopel et al. 2006). Moreover, recently, it was described neuroprotective effects of this exercise protocol in aversive memory

performance and biochemical parameters in cerebral areas of Wistar rats (Elsner et al. 2013; Lovatel et al. 2013; Spindler et al., 2014). Animals in the SED group were daily placed on the treadmill for 5 min without any stimulus to run. Gentle tapping on their back encouraged animals that initially refused to run. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study, and the treadmill exercise was performed between 2:00 and 5:00 PM.

2.3 Sample preparation

In order to verify the transitory and delayed exercise effects, rats were decapitated 1 and 18 hours after the last training session of treadmill exercise. It is important to cite that 1 h groups correspond to afternoon while 18 h ones correspond to early morning (Fig. 1). The trunk blood was collected, centrifuged (10.000 rpm) at room temperature for 10 min and the serum resultant was stored at -80 °C.

2.4 Circulating exosomes isolation

The exosomes isolation was performed using a commercial kit based on vesicles precipitation (miRCURY™ Exosome Isolation Kit, Exiqon, Denmark) following the manufacturer's instructions. Firstly, 0.6 mL serum was centrifuged for 5 min at 10.000 g to remove cell debris and the supernatant was transferred into a new vial. In the new vial, it was added 200 µL of precipitation buffer, mixed by vortexing and incubated for 60 minutes at 4°C. After the incubation, the sample was centrifuged for 30 min at 1.500 g at room temperature and the supernatant was completely discarded. The resultant exosome pellet was resuspended in 270 µL of resuspension buffer using a vortex shaker for 5 to 15 min at room temperature and then stored at -20°C. The size of serum-derived

nanoparticles was assessed using Nanosight nanoparticle characterization system LM10-HS (Nanosight Ltd., Amesbury, UK). NTA software indicated that the sizes of nanoparticles ranged from 90 to 300 nm.

2.5 CD63 levels

The specificity of our isolation procedure was characterized at the protein level by the presence of CD63, a membrane protein for exosomes. The CD63 levels were measured using a specific kit (ExoELISA kit, System Biosciences) following the manufacturer's instructions. In a 96-well plate, 50 µl of prepared protein standards or exosome sample were added and incubated overnight at 4°C. After incubation, 50 µl of the specific primary antibody CD63 was added and incubate at room temperature for 1 hour followed by incubation with secondary antibody. Finally, 50 µl of Super-sensitive TMB ELISA substrate was added and the absorbance was read at 450 nm. The CD63 levels were calculated by comparison to the standard curve per mg of total protein and expressed as percentage of control, where young adult SED group was taken as 100%.

2.6 Acetylcholinesterase (AChE) activity

The AChE activity was evaluated in exosomes samples by slight modifications in the colorimetric method described by Ellman and colleagues (1961) using acetylthiocholine iodide (Sigma, USA) as a substrate. The hydrolysis rate of acetylthiocholine iodide is measured at 412 nm through the release of the thiol compound that reacts with 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) DTNB producing the color-forming compound TNB. The AChE activity was normalized for total protein content.

2.7 Reactive species levels

Reactive species levels were quantified using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe (LeBel et al. 1992). In a 96-well plate, 15 μ l of exosomes solution were incubated with DCFH-DA (100 μ M) at 37 °C for 30 min. The oxidized fluorescent derivative (DCF) formation was monitored at excitation (488 nm) and emission (525) wavelengths using fluorescence spectrophotometer. All procedures were performed in the dark, while the blanks containing DCFH-DA (no exosomes) were processed for auto fluorescence measurement (dos Santos Moysés et al. 2014). Reactive species content was measured using a DCF standard curve and normalized for total protein.

2.8 Superoxide dismutase (SOD) activity

The superoxide dismutase activity was evaluated in exosomes sample using a specific kit following the manufacturer's instructions (RANSOD kit, Randox Labs, USA). This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide anion radical that reacts with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 phenyltetrazolium chloride (I.N.T.) to form a red formazan dye, which is measured at 37 °C using a spectrophotometer reader (505 nm). The inhibition of chromogen production is proportional to the enzyme activity in the sample. The units of SOD activity were normalized for total protein.

2.9 A β ₁₋₄₂ peptide levels

The A β ₁₋₄₂ peptide levels were measured using a specific kit (Sensolyte ELISA kit- AnaSpec, Fremont, CA) following the manufacturer's instructions. In a 96-well plate, 100 μ l of diluted standards or serum-derived exosome sample and

50 μ l of the diluted detection antibody solution were added, the plate was incubated overnight at 4 °C. After incubation, 100 μ l of TMB Color Substrate Solution was added in each well followed by addition of 50 μ l of the Stop Solution. The plate was read at 450 nm using a microplate absorbance reader. A β ₁₋₄₂ peptide levels were quantified using a standard curve and normalized for total protein.

2.10 Total protein quantification

The total protein content of circulating exosomes was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

2.11 Statistical analysis

The results were expressed as percentage of control (mean \pm SD), where young adult SED group was taken as 100%. Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) with age and exercise as factors followed by Tukey post hoc test when appropriate. The accepted level of significance was $p < 0.05$ in all tests.

3. Results

The ability of exosome isolation by commercial kit based on vesicles precipitation was determined using CD63 levels, a typical exosomal marker. Two-way ANOVA showed an age effect on CD63 levels ($F_{(2,35)}=11.788$; $p < 0.001$) since this parameter was decreased in 21- and 26-month-old rats compared to young adult groups in the afternoon (Fig. 2A, Tukey's post hoc, $p < 0.05$). In

addition, this age-dependent response disappeared in the early morning (Fig. 2B, 18h groups; two-way ANOVA, $F_{(2,33)}=0.741$; $p=0.486$). It is important to consider that samples were obtained 1 and 18 hours after the last training session of treadmill exercise to verify the transitory and delayed exercise effects, respectively; they were obtained at afternoon and early morning period. A delayed exercise effect was observed on CD63 levels, since this exosomal mark was almost 15% greater in exercised rats (Fig. 2B; two-way ANOVA, $F_{(1,33)}=4.292$; $p=0.048$).

There were increased exosomal AChE activities in both aged groups, 21- and 26-months-old rats, compared to young adult ones (Fig.3A and Fig.3B, respectively, $F_{(2,30)}=3.661$; $p=0.040$; $F_{(2,27)}=4.420$; $p=0.024$; two-way ANOVA). Furthermore, two-way ANOVA showed an exercise effect (Fig. 3B; $F_{(1,27)}=10.659$, $p=0.004$) as well as an interaction between age and exercise factors ($F_{(2,27)}=5.245$, $p=0.014$), since exercise was able to reverse the increase AChE activity in aged rats 18 hours after the last session indicating a delayed exercise effect (Fig. 3B).

A significant effect of age on reactive species levels from circulating exosomes (Fig.4A and Fig.4B) was observed in both time of day (two-way ANOVA, $F_{(2,26)}=10.371$; $p=0.001$ and $F_{(2,32)}=22.889$, $p<0.001$, respectively, 1h and 18 h groups). Aged animals (21- and 26-month-old) showed higher reactive species levels compared to young adult ones (Tukey post hoc, $p<0.05$). In addition, there was a delayed exercise effect on exosomal DCF levels (two-way ANOVA, $F_{(1,32)}=16.470$, $p<0.001$), given that our exercise protocol was able to decrease reactive species levels 18 hours after the last session at all ages (Tukey post hoc, $p<0.05$; Fig.4B).

There was an age effect in the exosomal SOD activity (two-way ANOVA, $F_{(2,29)}=8.948$; $p=0.001$), because it was observed a lower activity in the oldest-old (26-month-old) rats compared to 3 month-old ones (Fig.5B). However, there were no differences on exosomal SOD activity in 1 hour groups ($F_{(2,33)}=1.491$; $p=0.224$, Fig.5A).

Additionally, the $A\beta_{1-42}$ peptide levels remained unchanged in all groups evaluated (two-way ANOVA; Fig. 6A, $F_{(5,31)}=2.072$; $p=1.01$ and Fig. 6B, $F_{(5,31)}=1.727$; $p=1.6$).

4. Discussion

The current study adds evidence for the role of exosomes in the aging process. To our knowledge, this is the first study describing the aging process impact and exercise effects on circulating exosomes. Interesting findings regarding peripheral exosome markers, such as CD63 levels and AChE activity were here demonstrated in aged samples, therefore, it is possible to suggest that the aging process alters the circulating exosomes profile.

A clear temporal profile was observed in CD63 content, since aged groups have decreased exosomal CD63 levels compared to young adult rats only in the afternoon period. This result can be related to failure of cellular waste disposal processes in healthy aging (Terman & Brunk 2004) taken that exosomes seem be involved in the waste removal (Johnstone et al. 1991). Although the exosomes isolation has been performed using a significantly reproducible method based on vesicles precipitation and the Nanosight™ technology was used to characterize these vesicles, it is impossible to exclude that other particles, such as chylomicrons that share the same size range (75–1200 nm), are present in

isolated exosome sample. However, the quantification of CD63, a specific exosome marker, was performed.

Considering that substantial evidence has demonstrated an intrinsic ability of the exosomes to cross the blood-brain barrier (BBB) (Lakhal & Wood, 2011; Skog et al., 2008), it is reasonable to suppose that neural secreted exosome can carry the central AChE to the blood. In addition, the increased circulating exosomal AChE activity here observed may reflect its central nervous system (CNS) loss in aged animals, since a decreased age-related cholinergic system function it has been described in distinct brain areas (Haider et al. 2014; Stein et al. 2015; Ypsilanti et al. 2008). Besides, our result indicates that this enzyme is not adequate to quantify exosomes in the aging process.

In this study, for the first time, it was observed an increased reactive species levels in circulating exosomes of 21- and 26-month old rats compared to young adult ones. At this moment, it is impossible to affirm if reactive species are generated as an intrinsic production, since studies using platelet-derived exosomes from septic shock patients suggested a reactive species generation by NADPH oxidase and nitric oxide synthase enzymes (Azevedo et al. 2007; Gambim et al. 2007; Janiszewski et al. 2004). In addition, exosomes can travel substantial distances; consequently, high reactive species content in circulating exosomes could reflect its tissue levels. Yet, as described above, exosomes are able to pass by the BBB from CNS to blood and vice versa (Lakhal & Wood, 2011; Skog et al., 2008), therefore, we can suppose that higher reactive species levels observed in circulating exosomes from aged rats can contribute to the central oxidative stress. In addition, taken that other microparticles, such as chylomicrons, could

be isolated with exosomes, we can not exclude the involvement of oxidative modification of chylomicrons in DCF levels observed in aged groups.

As observed in CD63 levels, the impact of aging on exosomal SOD activity has a clear temporal profile, because aged rats had lesser activities compared to young adult ones in the afternoon period. Once SOD may scavenge superoxide radicals (Halliwell 1975; Liu et al. 1993) and exosome was related to an exchange of SOD between different cells (Fröhlich et al. 2013) our result supports the idea that lesser protective molecules exchange contributes to an impaired cellular oxidative status in older tissues.

Although it has been suggested A β levels in circulating exosomes as a potential AD progression biomarker, this was the first work evaluating peripheral exosomal A β levels in the healthy aging process. An interesting idea regarding exosomal A β in different biological compartments can be proposed, since aged monkeys showed a decreased CSF exosomes A β levels associated to its accumulation in brain tissue (Yuyama et al. 2015), while in the present work there were no changes on circulating exosomal A β content. Therefore, we suggest that this work was unable to validate peripheral exosome A β as a good marker of aging.

It is important to cite that the moderate exercise protocol was able to increase CD63 levels at all ages evaluated 18 hours after the last session, representing a delayed exercise effect. Therefore, we can suggest that treadmill exercise increases the exosomal release into the circulation since CD63 is a specific exosome-associated protein. Corroborating our result, Frühbeis and colleagues (2015) demonstrated that acute exercise stimulates an increased

release of small extracellular vesicles into the circulation in physically active healthy men.

The link between exercise practice and oxidative status has been widely documented (Fraile-Bermúdez et al. 2015; Hammeren et al. 1992; Radák et al. 2001). Here, it was investigated the moderate daily exercise effects on circulating exosomes specifically reactive species content in different developmental stages. Exercise-induced decreased exosomal reactive species content was observed in all tested ages. Taken that moderate treadmill exercise did not alter SOD activity, an antioxidant enzyme, it is possible to infer that these declines are related to a reduced reactive species generation instead of altering the exosomal antioxidant system.

Given that the exosomes have a capacity to cross biological barriers, a lesser reactive species content observed in circulating exosomes might reflect the effect induced by exercise on reactive species tissular production. In this context, if peripheral-derived reactive species can be transferred to CNS by the exosomes, we can speculate that neuroprotective effects of our exercise protocol (Elsner et al. 2013; Lovatel et al., 2013) could be associated at least in part with its impact on reactive species levels observed in circulating exosomes.

Several works demonstrating the exercise effects on cardiometabolic variables in patients with Type 2 diabetes have been published. Jansen and colleagues (2013) in an elegant study using a diabetes cellular model demonstrated that an increased reactive species in extracellular vesicles (100 – 1000 nm), including exosomes, is involved in the pathophysiology of cardiovascular complications, specifically atherosclerotic lesions. Therefore, it is

possible to infer that the impact of exercise on reactive species in extracellular vesicles can be related to its protective effect in Type 2 diabetes.

Since exosomes are considered as mediators of intercellular communication, regulating cell signaling, it is possible to suggest that the exercise-induced changes on exosome profile can be responsible for its wide range of beneficial effects on the body, specially, preventing or treating oxidative stress-related diseases (Fraile-Bermúdez et al. 2015; Hammeren et al. 1992; Radák et al. 2001). An interesting finding that emerges from this work is the exercise protocol ability to decrease exosomal AChE activity in aged rats. Accumulating evidences have demonstrated that the use of AChE inhibitors (AChEIs) as a therapeutic strategy can improve cognition in neurodegenerative disorders, such as AD (Samadi et al. 2012; Yang et al. 2015). In this context, we can suggest a beneficial treadmill exercise cognitive effects can be at least in part related to its impact on exosomal AChE activity. Accordantly, other studies have demonstrated that exercise training can reduce hippocampal and cortical AChE activities impacting on cognitive functions (Jolitha et al. 2009; Kim & Kim, 2013).

5. Conclusion

In this study, we provide evidence that the healthy aging process and treadmill exercise can modify the exosomal profile. An important finding that emerges of this work is a disruption on circulating exosomes, evaluated by CD63 levels, in aged rats. Besides, increased reactive species levels were found in extracellular vesicles from aged rats, which can contribute to the age-related oxidative status. Moreover, the exercise can impact on peripheral exosomal content decreasing both reactive species levels and AChE activity which can be

related to its protective effects including in normal aging. Interestingly, the data here obtained contribute to understand and provide exciting lines of investigation of the exosomes role on healthy aging process and exercise effects.

Disclosure Statement

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (grant #nº476634/2013-01). CNPq fellowships (Dr. I.R. Siqueira; K. Bertoldi; L.R. Cechinel; B. Schallenberger).

References

Alegre E, Zubiri L, Perez-Gracia JL, González-Cao, M, Soria L, Martín-Algarra S, & González A, 2016. Circulating melanoma exosomes as diagnostic and prognostic biomarkers. *Clin Chim Acta*, 454, 28-32.

Azevedo LC, Janiszewski M, Pontieri V, Pedro MA, Bassi E, Tucci PJ & Laurindo FR, 2007. Platelet-derived exosomes from septic shock patients induce myocardial dysfunction. *Crit Care Med*, 11(6), R120.

Bellingham SA, Guo BB, Coleman BM & Hill AF, 2012. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases. *Front Physiol*, 3(124),1-10.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem*, 72(1-2), 248-254.

Cadenas E & Davies KJ, 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biol Med*, 29(3), 222-230.

Cechetti F, Fochesatto C, Scopel D, Nardin P, Gonçalves CA, Netto CA & Siqueira IR, 2008. Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain res*, 1188, 182-188.

Chivet M, Hemming F, Pernet-Gallay K, Fraboulet S & Sadoul R, 2012. Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system. *Front Physiol*, 3(145), 1-6.

Churchill JD, Galvez R, Colcombe S, Swain RA, Kramer AF & Greenough WT, 2002. Exercise, experience and the aging brain. *Neurobiol aging*, 23(5), 941-955.

dos Santos Moysés F, Bertoldi K, Spindler C, Sanches EF, Elsner VR, Rodrigues MAS & Siqueira IR, 2014. Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. *Physiol behav*, 129, 160-166.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V & Featherstone RM, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochempharmacol*, 7(2), 88-95.

Elsner VR, Lovatel GA, Moysés F, Bertoldi K, Spindler C, Cechinel LR, Muotri AR & Siqueira IR, 2013. Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study. *Exp gerontol*, 48(2), 136-139.

Fiandaca MS, Kapogiannis D, Mapstone M, Boxer A, Eitan E, Schwartz JB, Abner EL, Petersen RC, Federoff HJ, Miller BL & Goetzl EJ, 2015. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer Dem*, 11(6), 600-607.

Finkel T & Holbrook NJ, 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.

Fraile-Bermúdez AB, Kortajarena M, Zarrazquin I, Maquibar A, Yanguas JJ, Sánchez-Fernández CE, Gil S, Irazutas A & Ruiz-Litago F, 2015. Relationship between physical activity and markers of oxidative stress in independent community-living elderly individuals. *Exp gerontol*, 70, 26-31.

Franco OH, de Laet C, Peeters A, Jonker J, Mackenbach J & Nusselder W, 2015. Effects of physical activity on life expectancy with cardiovascular disease. *Arch intern med*, 165(20), 2355-2360.

Fröhlich D, Kuo WP, Frühbeis C, Sun JJ, Zehendner CM, Luhmann HJ, Pinto S, Toedling J, Trotter J & Krämer-Albers EM, 2014. Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369(1652), 1-13.

Frühbeis C, Helmig S, Tug S, Simon P & Krämer-Albers EM, 2015. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *J Extracell Vesicles*, 4, 1-11.

Gambim MH, Do Carmo ADO, Marti L, Veríssimo-Filho S, Lopes LR & Janiszewski M, 2007. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through

peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Crit Care Med*, 11(5), R107.

Gupta A & Pulliam L, 2014. Exosomes as mediators of neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 11(1), 68.

Haider S, Saleem S, Perveen T, Tabassum S, Batool Z, Sadir S, Liaquat L & Madiha S, 2014. Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age*, 36(3), 1291-1302.

Halliwell B, 1975. The superoxide dismutase activity of iron complexes. *FEBS lett*, 56(1), 34-38.

Halliwell B, 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem*, 21-40.

Hammeren J, Powers S, Lawler J, Criswell D, Martin D, Lowenthal D & Pollock M, 1992. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle oxidative and antioxidant enzyme activity in senescent rats. *Int J Sports Med*, 13(5), 412-416.

Janiszewski M, Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR, 2004. Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: a novel vascular redox pathway. *Crit Care Med*, 32:818-825.

Jansen F, Yang X, Franklin BS, Hoelscher M, Schmitz T, Bedorf J, Nickening G & Werner N, 2013. High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovasc res*, 98(1), 94-106.

Jolitha AB, Subramanyam MVV & Devi AS, 2009. Age-related responses of the rat cerebral cortex: influence of vitamin E and exercise on the cholinergic system. *Biogerontology*, 10(1), 53-63.

Johnstone RM, Mathew A, Mason AB & Teng K, 1991. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J cell physiol*, (1991), 147(1), 27-36.

Kim G & Kim E, 2013. Effects of treadmill training on limb motor function and acetylcholinesterase activity in rats with stroke. *J Phys Ther Sci*, 25(10), 1227-1230.

Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, Floriach-Robert M, Boeve BF, Ivnik RJ, Smith GE, Dickson DW, Johnson KA, Petersen LE, McDonald WC, Braak H, Petersen RC, 2003. Neuropathology of cognitively normal elderly. *J Neuropathol Exp Neurol*, 11, 1087-1095.

Lakhal S & Wood MJ, 2011. Exosome nanotechnology: an emerging paradigm shift in drug delivery. *Bioessays*, 33, 737-741.

LeBel CP, Ischiropoulos H & Bondy SC, 1992. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem res toxicol*, 5(2), 227-231.

Lee Y, Andaloussi SE & Wood MJ, 2012. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum mol genet*, 21(R1), R125-R134.

Lehmann BD, Paine MS, Brooks AM, McCubrey JA, Renegar RH, Wang R & Terrian DM, 2008. Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer res*, 68(19), 7864-7871.

Lin TW, Shih YH, Chen SJ, Lien CH, Chang CY, Huang TY, Chen C, Huang T, Chen S, Jen C & Kuo Y, 2015. Running exercise delays neurodegeneration in amygdala and hippocampus of Alzheimer's disease (APP/PS1) transgenic mice. *Neurobiol learn mem*, 118, 189-197.

Liu J & Mori A, 1993. Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mech Ageing Dev*, 71(1), 23-30.

Lovatel GA, Elsner VR, Bertoldi K, Vanzella C, dos Santos Moysés F, Vizuete A, Spindler C, Cechinel LR, Netto CA, Muotri AR & Siqueira IR, 2013. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiol learn mem*, 101, 94-102.

Perez-Gonzalez R, Gauthier SA, Kumar A & Levy E, 2012. The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. *J Biol Chem*, 287(51), 43108-43115.

Price JL, McKeel Jr DW, Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M, Hansen LA, Petersen RC, Parisi JE, Dickson DW, Smith CD, Davis DG, Schmitt FA, Markesbery WR, Kaye J, Kurlan R, Hulette C, Kurland BF, Higdon R, Kukull W, Morris JC, 2009. Neuropathology of nondemented aging: Presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 30, 1026-1036.

Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsok J, Sasvári M, Nyakas C & Goto S, 2001. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemint*, 38(1), 17-23.

Samadi A, Estrada M, Pérez C, Rodríguez-Franco MI, Iriepa I, Moraleda I, Chioua M & Marco-Contelles J, 2012. Pyridonepezils, new dual AChE inhibitors as

potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease: Synthesis, biological assessment, and molecular modeling. *Euro j med chem* 57, 296-301.

Schorey JS & Bhatnagar S, 2008. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic*, 9(6), 871-881.

Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, Rabbo M, Belló-Klein A, Salbego C, Netto CA & Siqueira IR, 2006. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain res bull*, 71(1), 155-159.

Siqueira IR, Fochesatto C, de Andrade A, Santos M, Hagen M, Bello-Klein A & Netto CA, 2005. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *Int j dev neurosci*, 23(8), 663-671.

Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, Carter BS, Krichevsky AM & Breakefield XO, 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat cell biol*, 10(12), 1470-1476.

Spindler C, Cechinel LR, Basso C, Moysés F, Bertoldi K, Roesler R, Lovatel GA, Elsner VR & Siqueira IR (2014) Treadmill exercise alters histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in frontal cortices from wistar rats. *Cell mol neurobiol*, 34(8), 1097-1101.

Stein C, Hopfeld J, Lau H & Klein J, 2015. Effects of Ginkgo Biloba Extract EGb 761, Donepezil and their Combination on Central Cholinergic Function in Aged Rats. *J Pharm Pharm Sci*, 18(4), 634-646.

Swift DL, Lavie CJ, Johannsen NM, Arena R, Earnest CP, O'Keefe JH, Milani RV, Blair SN, Church TS, 2013. Physical activity, cardiorespiratory fitness, and exercise training in primary and secondary coronary prevention. *Circ J*, 77(2), 281-292.

Takahashi H, Fukumoto H, Maeda R, Terauchi J, Kato K & Miyamoto M, 2010. Ameliorative effects of a non-competitive BACE1 inhibitor TAK-070 on A β peptide levels and impaired learning behavior in aged rats. *Brain res*, 1361, 146-156.

Terman A & Brunk UT, 2004. Aging as a catabolic malfunction. *Int J Biochem Cell Biol*, 36(12), 2365-2375.

Théry C, Ostrowski M & Segura E, 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9(8), 581-593,

Weinreb O, Amit T, Bar Am O & Youdim MB, 2015. Neuroprotective effects of multifaceted hybrid agents targeting MAO, cholinesterase, iron and β -amyloid in ageing and Alzheimer's disease. *Br j pharmacol*, 1-15.

Yang RY, Zhao G, Wang DM, Pang XC, Wang SB, Fang JS & Du GH, 2015. DL0410 can reverse cognitive impairment, synaptic loss and reduce plaque load in APP/PS1 transgenic mice. *Pharmacol Biochem B*, 139, 15-26.

Ypsilanti AR, da Cruz MTG, Burgess A & Aubert I (2008) The length of hippocampal cholinergic fibers is reduced in the aging brain. *Neurobiol aging*, 29(11), 1666-1679.

Yuyama K, Sun H, Usuki S, Sakai S, Hanamatsu H, Mioka T, Kimura N, Okada M, Tahara H, Furukawa J, Fulitani N, Shinohara Y & Fujitani N, 2015. A potential function for neuronal exosomes: Sequestering intracerebral amyloid- β peptide. *FEBS let*, 589(1), 84-88.

Zou L, Yang R, Zhang P & Dai Y, 2010. The enhancement of amyloid precursor protein and β -site amyloid cleavage enzyme 1 interaction: amyloid- β production with aging. *Int j mol med*, 25(3), 401-407.

Figure Legends

Figure 1. Timeline of exercise protocol and sample collection. Animals were subjected to a treadmill exercise protocol 20 min/day during 14 days and samples were obtained 1 hour (afternoon) and 18 hours (morning) after the last exercise session.

Figure 2. Aging and exercise effects on CD63 levels in circulating exosomes from 3-, 21- and 26- month-old Wistar rats. The columns represent the mean \pm SD (% of control). Two-way ANOVA followed by Tukey's test. (A) 1 h groups, #Values significantly different from 3-month-old groups; (B) 18 h groups, *Values significantly different from its respective sedentary.

Figure 3. Aging and exercise effects on AChE activity in circulating exosomes from 3-, 21- and 26-month-old Wistar rats. The columns represent the mean \pm SD (% of control). Two-way ANOVA followed by Tukey's test. (A) 1 h groups, #Values significantly different from 3-month-old groups; (B) 18 h groups, #Values

significantly different from 3 month-old groups; *Values significantly different from its respective sedentary.

Figure 4. Aging and exercise effects on reactive species levels in circulating exosomes from 3-, 21- and 26-month-old Wistar rats. The columns represent the mean \pm SD (% of control). Two-way ANOVA followed by Tukey's test. (A) 1 h groups, #Values significantly different from 3-month-old groups; (B) 18 h groups, #Values significantly different from 3-month-old groups; *Values significantly different from its respective sedentary.

Figure 5. Aging and exercise effects on SOD activity in circulating exosomes from 3-, 21- and 26- month-old Wistar rats. The columns represent the mean \pm SD (% of control). Two-way ANOVA followed by Tukey's test. (A) 1 h groups; (B) 18 h groups #Values significantly different from 3-month-old groups.

Figure 6. Aging and exercise effects on $A\beta_{1-42}$ levels in circulating exosomes from 3-, 21- and 26- month-old Wistar rats. The columns represent the mean \pm SD (% of control). Two-way ANOVA followed by Tukey's test. (A) 1 h groups; (B) 18 h groups.

Figure 1.

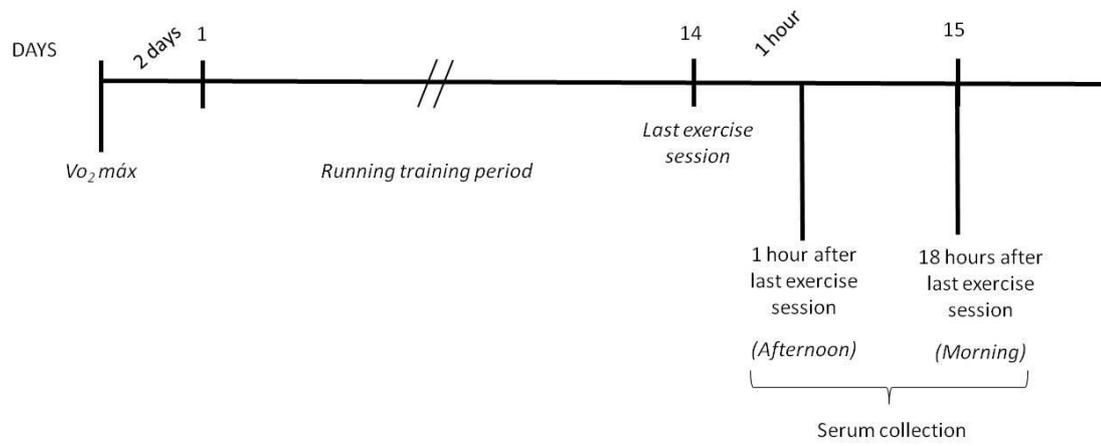


Figure 2.

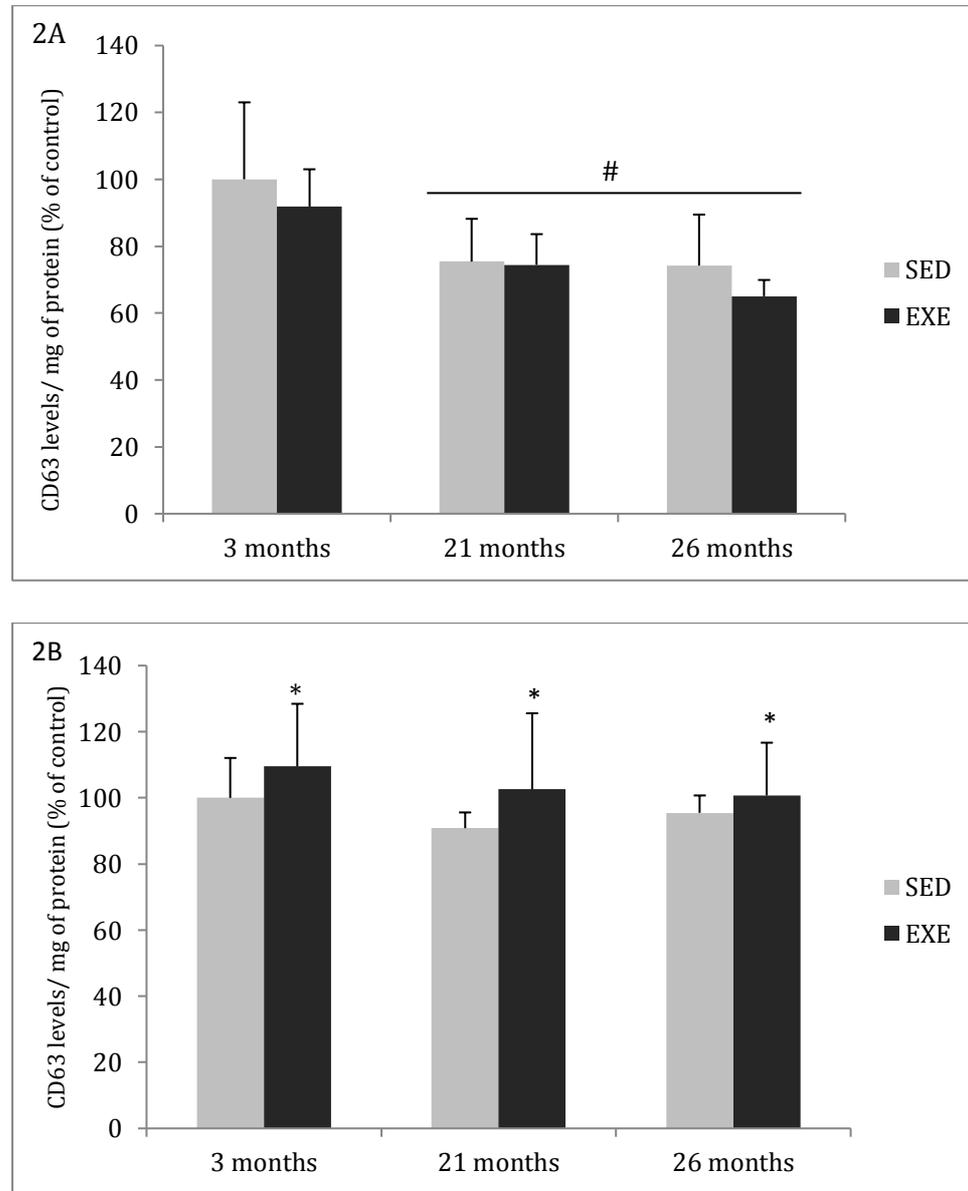


Figure 3.

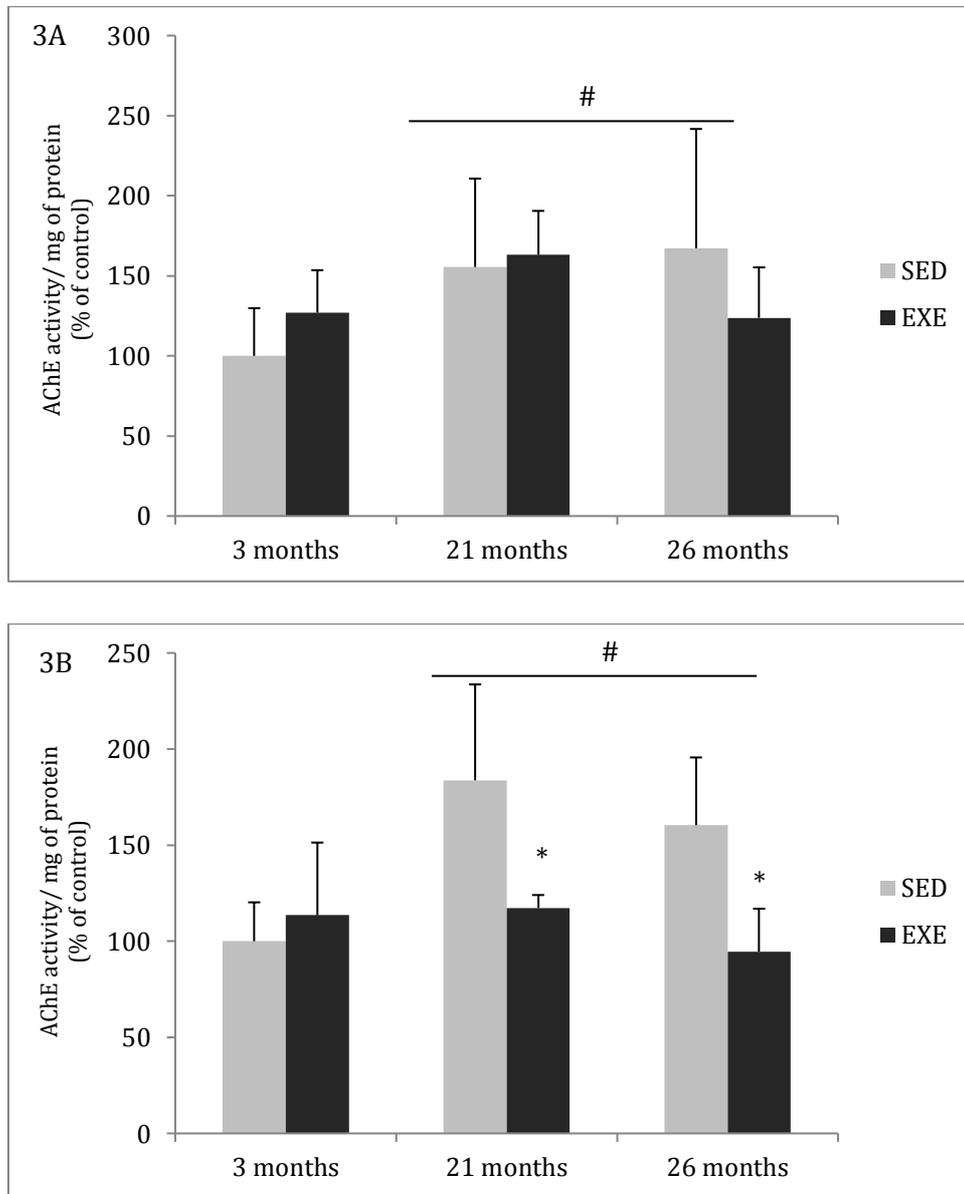


Figure 4.

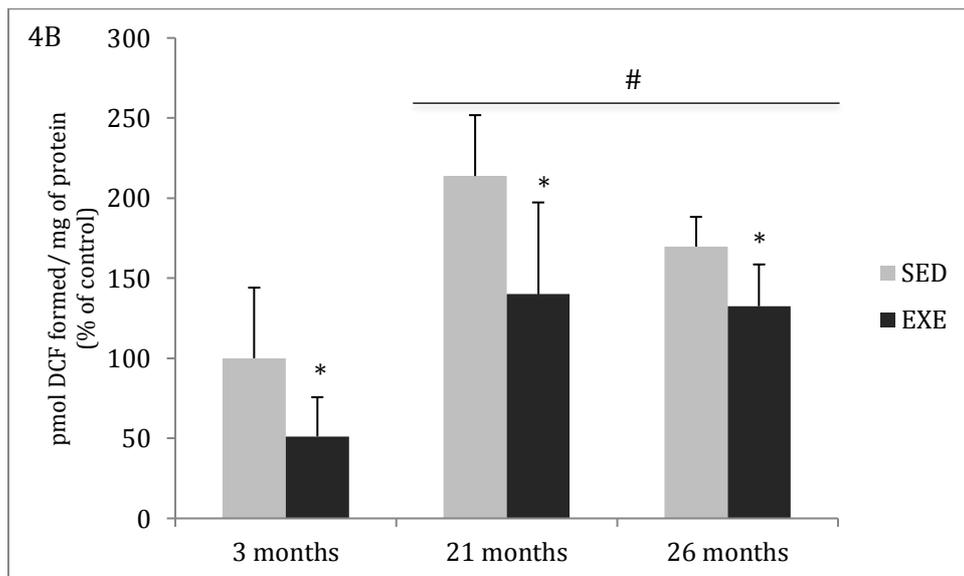
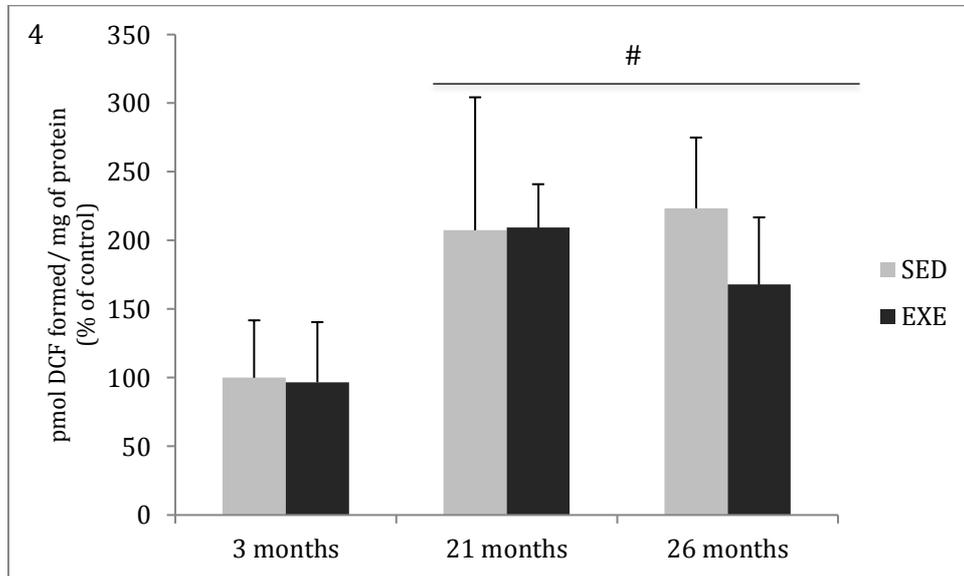


Figure 5.

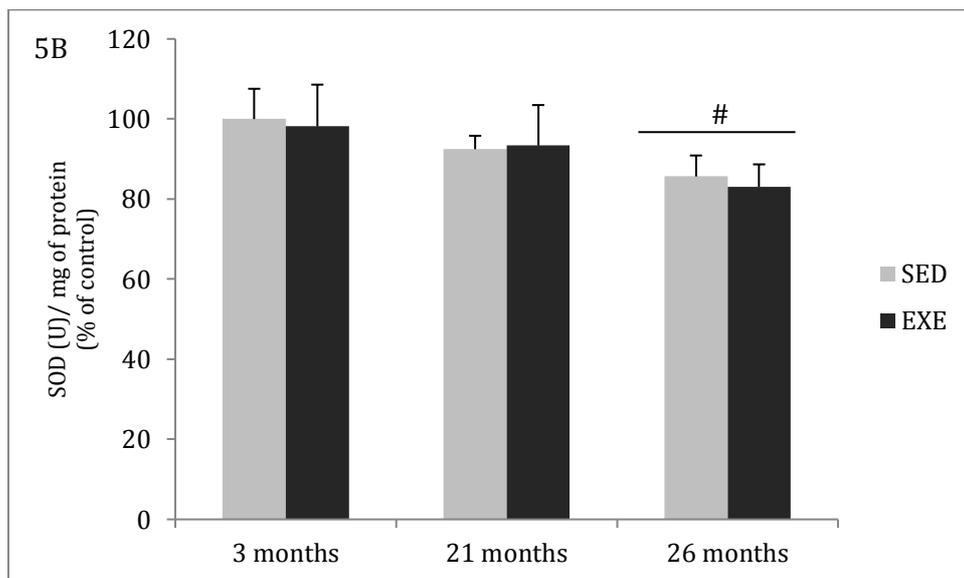
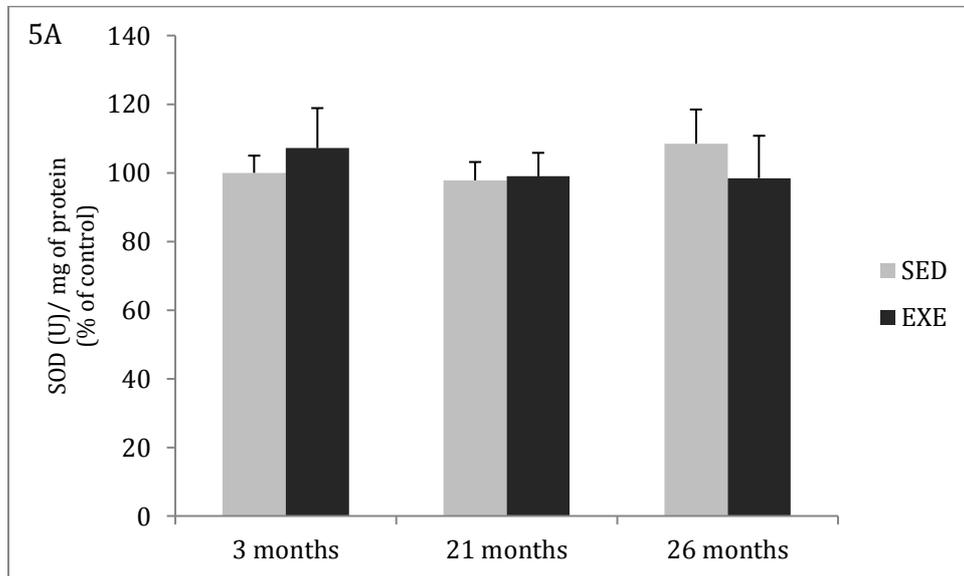
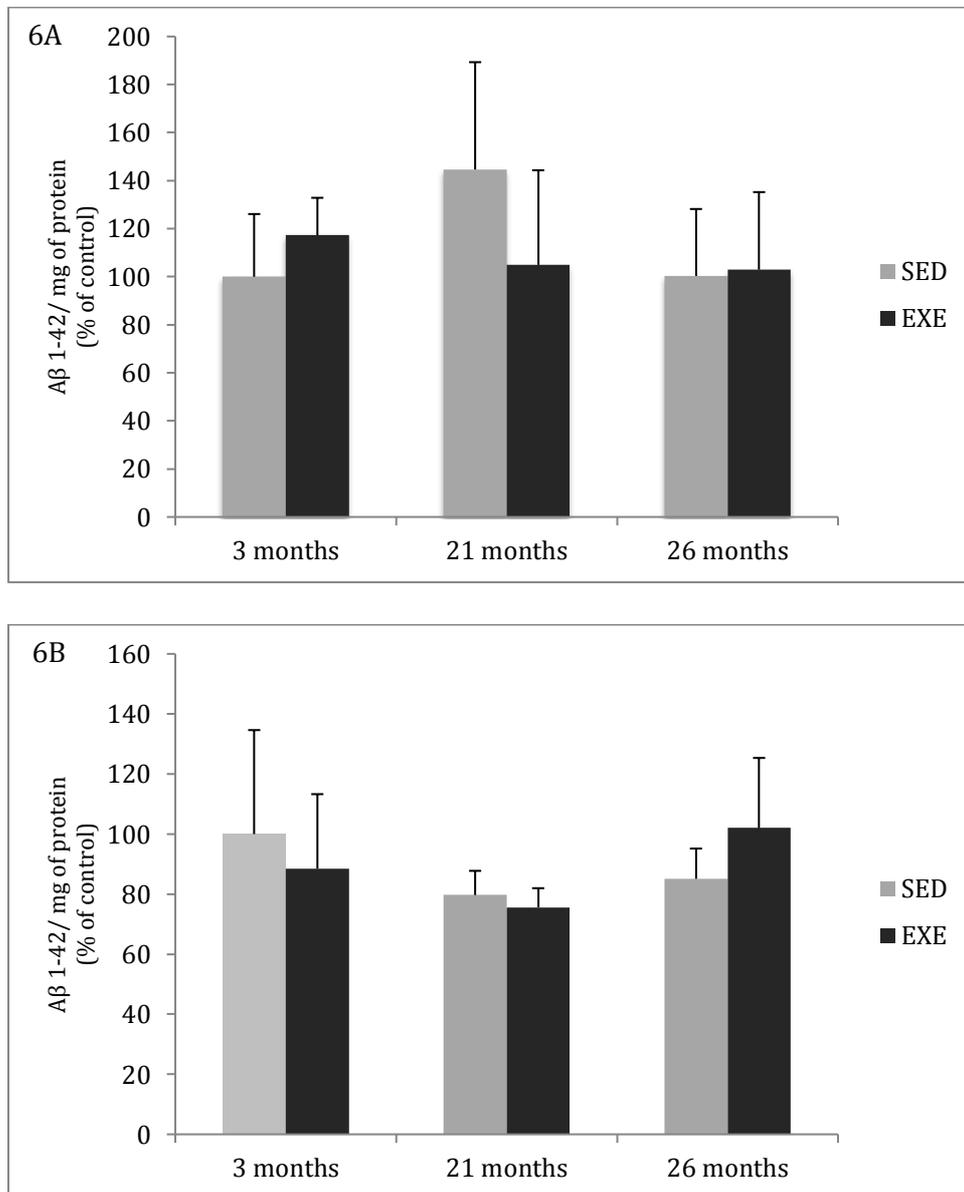


Figure 6.



6. Discussão

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem um envolvimento das vias amiloidogênica e não-amiloidogênica, representadas pela atividade das enzimas BACE e TACE, respectivamente, durante o envelhecimento cerebral. Além disso, foram observados resultados interessantes relacionados ao processo de envelhecimento e do exercício físico sobre o conteúdo e perfil de exossomos circulantes.

Neste contexto, um resultado relevante observado neste trabalho foi a diminuição da atividade da TACE (ADAM17) em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos envelhecidos. Corroborando estes resultados, níveis reduzidos de APP α , um produto derivado da clivagem da APP pela TACE, foram observados em LCR de ratos de 23 meses de idade (Anderson et al., 1999). É importante mencionar que diferentes funções como neuroproteção, neurotrofismo e neurogênese já foram atribuídas ao APP α . Desta forma, uma redução na atividade da TACE e, conseqüente redução nos níveis de APP α , no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos envelhecidos poderiam contribuir para o aumento da suscetibilidade destas estruturas aos danos relacionados a doenças neurodegenerativas. Além disso, indivíduos com DA apresentam níveis reduzidos de sAPP α em LCR sugerindo uma possível redução na atividade da enzima TACE (Pietri et al., 2013; Sennvik et al., 2000). Nosso trabalho apresentou resultados inéditos sobre o envolvimento da TACE encefálica no processo de envelhecimento fisiológico.

Uma vez que alterações na maquinaria do processamento da APP parecem estar fortemente relacionadas aos déficits de memória observados na DA, os animais jovens e envelhecidos foram submetidos ao teste da esQUIVA inibitória para avaliação da memória aversiva. Os resultados obtidos a partir deste teste indicam que os animais de 21 e 26 meses de idade apresentam um

déficit considerável na memória aversiva quando comparados aos animais adultos jovens. Portanto, podemos sugerir que o prejuízo de memória observado nos animais envelhecidos pode estar relacionado à diminuição na atividade cortical da TACE também observada em animais de 21 e 26 meses de idade. Dados da literatura corroboram nossos resultados, Bour e colegas (2004) demonstraram que o APP α é capaz de potencializar a memória espacial em camundongos assim como melhorar a potencialização de longo prazo (LTP) em fatias hipocâmpais de ratos (Taylor et al., 2008) sugerindo um forte envolvimento deste fragmento na memória.

Além de participar do processamento da APP, a TACE pode regular, parcialmente, os processos inflamatórios através da capacidade de clivar a forma do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) ligada à membrana (Black et al., 1997). É importante mencionar que vários estudos demonstram uma relação entre o desempenho nos testes de memória e os níveis de TNF- α ; no entanto, os resultados obtidos são controversos. Fiore e colegas (1996) observaram um prejuízo no teste da esQUIVA INIBITÓRIA realizado em camundongos transgênicos que superexpressam TNF- α . Por outro lado, alguns estudos sugerem um papel essencial do TNF- α nos processos de memória, uma vez que camundongos deficientes desta citocina, sob condições não inflamatórias, apresentam prejuízos no desempenho em testes de memória (Baune et al., 2008b). Ainda, um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando ratos Wistar de 21 meses de idade, não observou correlação entre os níveis de TNF- α e o desempenho dos animais no teste da esQUIVA INIBITÓRIA (Lovatel et al., 2013). Portanto, é possível especular que diferentes mecanismos relacionados ao TNF- α , como a atividade

da TACE, podem exercer efeitos modulatórios no desempenho em testes de memória.

A atividade da BACE, um índice de atividade da via amiloidogênica, também foi investigada neste trabalho. Embora os roedores sejam amplamente utilizados como modelos de envelhecimento, poucos estudos avaliam o impacto do processo de envelhecimento fisiológico sobre a atividade da BACE em estruturas cerebrais de ratos. Neste estudo foi observado um aumento da atividade da BACE em córtex pré-frontal de ratos de 26 meses de idade, portanto, podemos inferir que ratos Wistar são bons modelos para o estudo do envelhecimento cerebral. Em acordo, um estudo conduzido por Sinha e colaboradores (2016) demonstrou um aumento na atividade da BACE acompanhado por um aumento no conteúdo de A β 1-42 em córtex cerebral de animais de 22-24 meses de idade. Além disso, Fukomoto e colegas (2004) observaram níveis elevados de atividade da BACE em córtex e cerebelo de humanos e macacos envelhecidos assim como em camundongos transgênicos Tg2576. Adicionalmente, níveis elevados de A β 1-42 já foram descritos em ratos saudáveis de 26 meses de idade (Takahashi et al., 2010). Em conjunto, os resultados acima descritos sugerem um aumento da vulnerabilidade das estruturas cerebrais, principalmente do córtex, aos processos neurodegenerativos assim como ao desenvolvimento de doenças como a doença de Alzheimer.

Considerando que um aumento da atividade da BACE foi observado somente no córtex pré-frontal de animais envelhecidos, não se pode excluir a hipótese de que outros mecanismos possam estar envolvidos no envelhecimento hipocampal, uma vez que vias independentes da atividade da BACE como as

catepsinas já foram descritas (Hook et al., 2008). Além disso, os níveis totais de A β em diferentes regiões cerebrais podem ser alterados por diversos processos, como oligomerização, deposição e remoção (Fukomoto et al., 2004). É importante destacar que um prejuízo na remoção do peptídeo pode ser um mecanismo central no desenvolvimento da DA. Neste contexto, Mawuenyega e colegas (2010) observaram que as taxas de produção do A β 1-40 e A β 1-42 foram similares entre indivíduos com DA sintomática e indivíduos envelhecidos saudáveis, enquanto que menores taxas de remoção do A β foram observadas em pacientes com DA. Desta forma, é possível inferir que uma redução na remoção do A β pode estar diretamente relacionada à fisiopatologia da DA enquanto que as vias amiloidogênicas e não-amiloidogênicas, especificamente, a atividade das secretases parecem estar associadas ao aumento da suscetibilidade a doenças neurodegenerativas na idade avançada.

Ainda, embora os déficits de memória tenham sido observados nos animais envelhecidos, níveis elevados de atividade da BACE foram observados somente nos animais de 26 meses de idade. Portanto, é possível sugerir que o prejuízo cognitivo está mais relacionado às alterações na maquinaria do processamento da APP do que aos níveis do peptídeo A β . Além disso, a relação entre níveis de peptídeo A β e desempenho em testes de memória tem demonstrado resultados controversos. Diferentes trabalhos observaram que o A β pode levar tanto à melhora quanto ao déficit cognitivo, dependendo da sua forma e concentração (Lesné et al., 2006; Oh et al., 2011; Mura et al., 2012; Morley & Farr, 2014). Ainda, em um estudo de imagem *in vivo*, nenhuma correlação entre desempenho cognitivo e níveis cerebrais de peptídeo amiloide foi observada (Aizenstein et al., 2008).

Um resultado interessante oriundo deste trabalho é relacionado ao desequilíbrio da razão TACE/BACE em favor da atividade da BACE em cérebros envelhecidos, especificamente em hipocampo e córtex pré-frontal. Estes resultados podem estar relacionados ao aumento na suscetibilidade a doenças neurodegenerativas e podem induzir um ambiente celular que facilite a produção do peptídeo A β e a conseqüente formação de placas senis. É importante destacar que a perda da homeostase entre as vias amiloidogênica e não-amiloidogênicas induzida pelo envelhecimento foi dependente da estrutura uma vez que o desequilíbrio na atividade das enzimas, em favor da BACE, foi observado em córtex de animais de 21 e 26 meses enquanto que no hipocampo foi observado apenas nos animais mais velhos. Portanto, nossos resultados apoiam a estratégia farmacológica neuroprotetora de inibição da atividade da BACE, no entanto, cabe ressaltar que a eficácia desta estratégia pode variar conforme a estrutura e a idade testadas.

O envelhecimento não foi capaz de alterar o conteúdo hipocampal da APP. Nossos resultados corroboram aqueles obtidos por Anderson (1999) utilizando animais de 23 meses de idade, em que não foram observadas alterações no conteúdo de APP. Além disso, Flood e colaboradores (1997) demonstraram que níveis corticais de mRNA da APP permaneceram inalterados durante o envelhecimento.

Trabalhos recentes sugerem a quantificação de níveis de A β em exossomos circulantes como biomarcadores para avaliar a progressão da DA (Fiandaca et al., 2015), no entanto, ao nosso conhecimento, este foi o primeiro trabalho avaliando os níveis de A β em exossomos periféricos durante o processo de envelhecimento fisiológico. A partir dos resultados obtidos podemos inferir

que existe uma distribuição distinta do A β em diferentes compartimentos biológicos. Yuyama e colegas (2015) demonstraram uma diminuição nos níveis exossomais de A β no LCR associado ao seu acúmulo em tecidos cerebrais de macacos envelhecidos por outro lado, nossos resultados não demonstraram nenhuma alteração nos níveis do peptídeo em exossomos circulantes de ratos envelhecidos. Portanto, é possível sugerir que o conteúdo exossomal periférico de A β não seja um bom marcador de envelhecimento em ratos. Ainda, uma vez que os níveis de A β exossomais permaneceram inalterados em todas as idades avaliadas neste estudo é possível sugerir que o aumento da atividade da enzima BACE observado no córtex dos animais de 26 meses de idade não foi capaz de impactar nos níveis periféricos deste peptídeo. É importante destacar que um dos objetivos deste estudo foi avaliar o conteúdo de A β em exossomos circulantes em animais jovens e envelhecidos saudáveis, no entanto, não podemos excluir uma relação entre alterações na atividade central da enzima BACE e o conteúdo de A β periférico na DA.

No presente trabalho foram encontrados resultados interessantes sobre os marcadores de exossomos como a proteína de membrana CD63 e a atividade da AChE. É importante ressaltar que embora o isolamento dos exossomos tenha sido realizado utilizando um método significativamente reproduzível baseado na precipitação de vesículas além de utilizar o NTA para sua caracterização é impossível excluir que outras partículas como os quilomícrons (75-1200 nm) possam estar presentes na amostra. No entanto, a quantificação do CD63, uma proteína de membrana específica de exossomos, foi realizada.

O processo de envelhecimento foi capaz de alterar o perfil de exossomos circulantes aumentando a atividade exossomal da AChE e diminuindo os níveis de

CD63. A diminuição do CD63 observada neste trabalho sugere uma possível redução no conteúdo de exossomos em animais envelhecidos

Entre as diferentes teorias descritas relacionadas ao processo de envelhecimento a incapacidade do organismo de remover materiais indesejados levando ao acúmulo de proteínas e outros resíduos prejudiciais ao organismo têm recebido grande atenção. Visto que os exossomos inicialmente foram associados à função de “limpeza” ou “remoção” de materiais indesejados, uma diminuição no seu conteúdo durante o envelhecimento poderia prejudicar o sistema de remoção destes materiais levando ao seu acúmulo e consequente toxicidade (Johnstone et al., 1991; Terman & Brunk, 2004). Adicionalmente, uma diminuição na atividade exossomal da AChE foi observada em animais envelhecidos. Várias evidências demonstram que o sistema colinérgico está prejudicado durante o processo de envelhecimento em diversas regiões cerebrais (Haider et al., 2014; Stein et al., 2015; Ypsilanti et al., 2008). Considerando a habilidade intrínseca dos exossomos em atravessar a BHE (Kanninen et al., 2015; Lakhal & Wood, 2011; Skog et al., 2008) é possível especular que exossomos neurais poderiam carrear a AChE e outros componentes do sistema colinérgico do SNC para o sangue periférico. Portanto, o aumento da atividade da AChE observado poderia refletir as alterações do sistema colinérgico central relacionadas ao envelhecimento. Ainda, este resultado indica que a atividade da AChE não é uma medida adequada para quantificar conteúdo de exossomos em animais envelhecidos.

Embora diversas evidências demonstrem um importante papel do estresse oxidativo durante o processo de envelhecimento (Cadenas & Davies, 2000; Finkel & Holbrook, 2000), ao nosso conhecimento não existem trabalhos

investigando a relação entre estresse oxidativo e exossomos no envelhecimento fisiológico. Neste estudo, foi observado um aumento nos níveis de espécies reativas em exossomos circulantes de ratos de 21 e 26 meses de idade comparados aos animais adultos jovens. Até o momento, não é possível afirmar se as espécies reativas exossomais são geradas intrinsecamente. Alguns autores demonstraram uma produção intrínseca de espécies reativas geradas através das enzimas NADPH oxidase e óxido nítrico sintase, em exossomos derivados de plaquetas de pacientes diagnosticados com choque séptico (Azevedo et al., 2007; Gambim et al., 2007; Janiszewski et al., 2004). Ainda, considerando que os exossomos possuem a capacidade de percorrer longas distâncias, altos níveis de radicais livres em exossomos circulantes poderiam refletir os níveis teciduais destas espécies. Devido a habilidade dos exossomos em atravessar a BHE do SNC para o sangue e vice-versa (Kanninen et al., 2015; Lakhali & Wood, 2011; Skog et al., 2008), é possível sugerir que altos níveis de espécies reativas observadas em exossomos circulantes de ratos envelhecidos contribuam para o aumento do estresse oxidativo central.

É interessante destacar que uma diminuição da atividade exossomal da SOD em animais de 26 meses de idade comparada aos animais adultos jovens foi observada. A atividade antioxidante da SOD como sequestradora do radical superóxido já está bem descrita na literatura (Halliwell, 1975; Liu & Mori, 1993). Recentemente um estudo realizado por Fröhlich e colegas (2014) demonstrou que os exossomos são capazes de transportar/transferir as enzimas SOD e CAT entre oligodendrócitos e neurônios. Portanto, podemos sugerir que uma diminuição na troca de SOD entre diferentes células promovida pelos exossomos

em animais de 26 meses poderia contribuir para o prejuízo oxidativo observado em diferentes tecidos durante o envelhecimento.

Outro resultado observado neste trabalho foi a influência do período do dia em que os animais foram eutanasiados, 1 hora (período da tarde) e 18 horas (cedo da manhã), após a última sessão de exercício sobre os parâmetros bioquímicos. Os tempos de coleta das amostras foram escolhidos baseados em resultados prévios do nosso grupo de pesquisa os quais demonstraram efeitos transitórios (1 hora) e tardios (18 horas) do protocolo de exercício em diferentes estruturas cerebrais de ratos adultos jovens e envelhecidos (Elsner et al., 2011; 2013; Lovatel et al., 2013). A influência do período do dia foi observada na atividade das enzimas secretases em córtex pré-frontal durante o envelhecimento. Um claro padrão temporal pode ser identificado uma vez que as atividades das enzimas TACE e BACE foram alteradas somente no período da tarde (grupos 1 hora). Por outro lado, alterações na atividade hipocampal das secretases foram observadas em ambos os períodos avaliados. Desta forma, é possível especular que regiões cerebrais distintas podem responder diferentemente às influências do ritmo circadiano. Neste contexto, uma vez que a melatonina é capaz de aumentar a atividade enzimática da TACE (Waldhauser et al., 1998) e estudos demonstram que a melatonina está diminuída durante o envelhecimento (Harper et al., 2005) podemos sugerir que níveis reduzidos de melatonina estão relacionados a menor atividade da TACE em córtex de animais envelhecidos. Em relação à atividade da BACE, é possível observar que esta enzima apresenta a atividade aumentada em córtex de animais envelhecidos no período da tarde. Alterações no ritmo de repouso-atividade já foram observadas tanto em pacientes com DA quanto em modelos experimentais de DA (Flood et

al., 1997; Lin et al., 2015; Solas et al., 2010). Em um estudo realizado por Blake e colegas (2015) usando um modelo de *Drosophila* foi demonstrado que um aumento na expressão de BACE é capaz de alterar o ritmo de repouso-atividade especialmente em animais envelhecidos com um mecanismo independente da produção do peptídeo A β . Uma vez que os inibidores da BACE tem sido considerados potenciais alvos farmacológicos (Ballard et al., 2011; Takahashi et al., 2010) para o tratamento da DA, é possível sugerir que estudos utilizando inibidores da BACE in vivo devem considerar a hora do dia de administração. Neste contexto, nossos resultados sugerem que o período da tarde seria o horário mais apropriado para a administração destes inibidores em roedores. Portanto, os resultados encontrados abrem novas questões a serem investigadas sobre a modulação da atividade das secretases pelo ritmo circadiano durante o processo de envelhecimento.

Em relação ao conteúdo de exossomos, também foi possível observar um claro padrão temporal uma vez que os níveis de CD63, e conseqüentemente, os níveis de exossomos estavam reduzidos somente no período da tarde (grupos 1 hora) nos animais envelhecidos comparados aos animais adultos jovens.

Desta forma, a partir do que foi discutido acima é possível afirmar que os resultados obtidos, tanto com a atividade das secretases quanto em relação aos exossomos, podem estar associados às alterações na ritmicidade características do processo de envelhecimento (Hu et al., 2009; Stranaham et al., 2012).

Outro importante ponto a ser discutido é referente ao protocolo neuroprotetor de exercício físico, corrida em esteira durante 2 semanas, que apesar de ter melhorado o desempenho dos animais de todas as idades no teste da esQUIVA inibitória não foi capaz de alterar a atividade das enzimas BACE e

TACE, em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos Wistar em ambos os tempos avaliados. Conseqüentemente, não foram observados efeitos transitórios e tardios deste protocolo de exercício em nenhuma das idades avaliadas.

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que este protocolo de exercício melhorou transitoriamente o desempenho dos animais adultos jovens e envelhecidos no teste da esQUIVA inibitória. Além disso, neste mesmo trabalho, o exercício foi capaz de reduzir as citocinas pró-inflamatórias em animais envelhecidos enquanto que aumentou as citocinas anti-inflamatórias em animais adultos jovens (Lovatel et al., 2013) demonstrando um perfil bioquímico dependente da idade. Além disso, em outro estudo realizado com o mesmo protocolo de exercício, baixos níveis de acetilação da histona H4 foram transitoriamente revertidos pelo exercício físico sem nenhum efeito em animais jovens, reforçando os possíveis efeitos idade dependente deste protocolo de exercício. Portanto, é possível sugerir que os benefícios do exercício físico observados na melhora no desempenho cognitivo neste trabalho são independentes da modulação do exercício sobre as vias amiloidogênicas e não-amiloidogênicas. No entanto, como citado acima, não podemos excluir que outras vias e diferentes mecanismos celulares estejam envolvidos com os efeitos cognitivos do exercício físico.

O efeito do exercício físico diário moderado também foi avaliado sobre o conteúdo hipocampal de APP, no entanto, nenhuma diferença significativa foi observada nas idades avaliadas. Portanto, podemos sugerir que o protocolo de exercício utilizado não foi capaz de alterar o conteúdo de APP no hipocampo destes animais. Recentemente, um estudo utilizando camundongos transgênicos

APP/PS1 de 4 meses de idade demonstrou que os níveis hipocámpais de APP não foram alterados após 10 semanas de exercício físico em esteira (Lin et al., 2015).

O protocolo de exercício físico moderado aumentou o conteúdo de CD63 em todas as idades avaliadas 18 horas após a última sessão de exercício demonstrando um efeito tardio deste protocolo. Portanto, podemos sugerir que o exercício físico aumenta a liberação de exossomos para a circulação, uma vez que a CD63 é uma proteína de membrana específica de exossomos. Corroborando nossos resultados, Frühbeis e colaboradores (2015) demonstraram que a prática de exercício agudo promove um aumento na liberação de pequenas vesículas extracelulares para a circulação em homens saudáveis fisicamente ativos.

Além do seu efeito sobre o aumento na liberação de exossomos, o protocolo utilizado demonstrou efeitos tardios sobre os níveis exossomais de radicais livres. A relação entre a prática de exercício físico e o estado oxidativo de diferentes órgãos e sistemas tem sido amplamente investigada (Fraile-Bermúdez et al., 2015; Hammeren et al., 1992; Quindry et al., 2005; Radák et al., 2001). Neste trabalho, níveis reduzidos de espécies reativas contidas nos exossomos circulantes foram observados em animais exercitados de 3, 21 e 26 meses de idade. Além disso, é possível sugerir que os benefícios do exercício estão relacionados à redução das espécies reativas e não à modulação exossomal do sistema antioxidante uma vez que a atividade da SOD permaneceu inalterada. Desta forma, visto que as espécies reativas podem ser transferidas do SNC para outros tecidos através dos exossomos, pode-se especular que os efeitos neuroprotetores do protocolo de exercício utilizado estão parcialmente

associados à sua capacidade de reduzir os níveis exossomais de espécies reativas.

Diversos trabalhos demonstrando os efeitos do exercício físico sobre variáveis cardiometabólicas em paciente com diabetes tipo 2 têm sido realizados. Um estudo conduzido por Jansen e colegas (2013), usando um modelo celular de diabetes, demonstrou que um aumento de espécies reativas em vesículas extracelulares (100–1000 nm), incluindo exossomos está envolvido às complicações de patologia cardiovascular, especificamente, lesões ateroscleróticas. Portanto, é possível inferir que o impacto do exercício físico sobre os níveis de espécies reativas contidas em exossomos circulantes pode estar relacionado ao seu efeito neuroprotetor no diabetes tipo 2. Uma vez que os exossomos são considerados mediadores da comunicação intercelular, regulando a sinalização celular, podemos sugerir que as alterações moduladas pelo exercício sobre o perfil dos exossomos estão associadas à sua variada gama de efeitos benéficos em diversos sistemas e órgãos assim como na prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (Fraile-Bermúdez et al., 2015; Hammeren et al., 1992; Quindry et al., 2005; Radák et al., 2001).

Outro resultado interessante encontrado neste trabalho foi a capacidade do protocolo de exercício físico diminuir a atividade exossomal da AChE em animais envelhecidos. Diversas evidências têm sugerido o uso de inibidores da atividade da AChE (AChEIs) como estratégia terapêutica capaz de melhorar a cognição em doenças neurodegenerativas como a DA (Samadi et al., 2012; Yang et al., 2015). Portanto, nós podemos sugerir que os efeitos benéficos do exercício físico em esteira sobre a memória aversiva, avaliada neste estudo, estão relacionados, pelo menos em parte, ao seu impacto na atividade exossomal da

AChE. Corroborando estes resultados, outros estudos têm demonstrado que o exercício físico é capaz de reduzir a atividade da AChE em estruturas cerebrais como o hipocampo e o córtex (Jolitha et al., 2009; Kim & Kim, 2013).

O protocolo de exercício físico utilizado neste trabalho não alterou o conteúdo exossomal de A β 1-42 nas idades avaliadas. Este resultados, corroboram, pelo menos em parte, os resultados observados em relação à via amiloidogênica do processamento da APP uma vez o exercício não foi capaz de alterar a atividade da BACE em córtex pré-frontal e hipocampo de animais adultos jovens e envelhecidos.

Os resultados apresentados, tanto em relação às vias amiloidogênica e não-amiloidogênica em estruturas cerebrais quanto em relação ao perfil de exossomos circulantes de ratos jovens e envelhecidos podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos relacionados ao processo de envelhecimento. Estes resultados são relevantes uma vez que o aumento da expectativa de vida torna necessário o estudo das alterações relacionadas ao processo de envelhecimento com o objetivo de desenvolver estratégias que promovam uma melhor qualidade de vida para esta população. Neste contexto, a prática de exercício físico pode ser utilizada como uma estratégia não farmacológica para promover alterações benéficas a estes indivíduos, no entanto, apesar das contribuições oriundas deste trabalho, mais estudos são necessários para esclarecer as alterações relacionadas ao processo de envelhecimento e o papel da atividade física neste processo.

7. Conclusões

- ✓ Uma diminuição na atividade da via não-amiloidogênica pode estar parcialmente associada aos prejuízos de memória aversiva relacionados à idade.
- ✓ O desequilíbrio entre as atividades das vias amiloidogênica e não-amiloidogênica, a favor da amiloidogênica, pode contribuir para o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.
- ✓ O processo de envelhecimento é capaz de alterar o perfil dos exossomos circulantes.
- ✓ O aumento das espécies reativas observado em exossomos circulantes de ratos envelhecidos pode contribuir para o estado oxidativo característico do envelhecimento.
- ✓ O protocolo de exercício físico melhorou a memória aversiva dos animais adultos jovens e envelhecidos independente de alterações nas vias de processamento da APP.
- ✓ A prática de exercício físico moderado foi capaz de aumentar o conteúdo de CD63 em ratos adultos jovens e envelhecidos sugerindo um possível aumento de exossomos periféricos induzido pelo exercício.
- ✓ A redução do conteúdo de espécies reativas e da atividade da AChE em exossomos circulantes podem estar relacionadas aos efeitos protetores da prática de atividade física durante o processo de envelhecimento fisiológico.
- ✓ Os resultados apresentados contribuem para a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento e a modulação induzida pelo exercício físico neste processo.

8. Referências Bibliográficas

- Abbott, N. J. (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cellular and molecular neurobiology*, 25(1), 5-23.
- Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW (2005) Voluntary Exercise Decreases Amyloid Load in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 25:4217-4221.
- Aizenstein HJ, Nebes RD, Saxton JA, Price JC, Mathis CA, Tsopelas ND, Ziolkowski SK, James JA, Snitz BE, Houck PR, Bi W, Cohen AD, Lopresti BJ, DeKosky ST, Halligan EM, Klunk WE (2008) Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Archives of Neurology*. 65, 1509-1517.
- Albeck DS, Sano K, Prewitt GE, Dalton L (2006) Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behavioural Brain Research* 168:345-348.
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhani, S., & Wood, M. J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*, 29(4), 341-345.
- Amaral OB, Luft T, Cammarota M, Izquierdo I, Roesler R (2007) Temporary inactivation of the dorsal hippocampus induces a transient impairment in retrieval of aversive memory. *Behavioural Brain Research* 180:113-118.
- An, K., Klyubin, I., Kim, Y., Jung, J. H., Mably, A. J., O'Dowd, S. T., Lynch, T., Kanmert, D., Lemere, C. A., Finan, G. M., Park, J.W., Kim, T. W., Walsh, D. M., Rowan, M. J. & Park, J. W. (2013). Exosomes neutralize synaptic-plasticity-disrupting activity of A β assemblies in vivo. *Molecular Brain*, 6, 47.
- Annaert W, De Strooper B. (2002). A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*; 18:25 – 51.
- Anderson JJ, Holtz G, Baskin PP, Wang R, Mazarulli L, Wagner SL, Menzaghi F (1999) Reduced cerebrospinal fluid levels of α -secretase-cleaved amyloid precursor protein in aged rats: correlation with spatial memory deficits. *Neuroscience* 93:1409-1420.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 70(2), 200-214.
- Atwood, C. S., Obrenovich, M. E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M. A., & Martins, R. N. (2003). Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . *Brain Research Reviews*, 43(1), 1-16.
- Awick, E. A., Wójcicki, T. R., Olson, E. A., Fanning, J., Chung, H. D., Zuniga, K., Mackenzie, M., Kramer, A. F., & McAuley, E. (2015). Differential exercise effects on quality of life and health-related quality of life in older adults: a randomized controlled trial. *Quality of Life Research*, 24(2), 455-462.
- Azevedo, L. C., Janiszewski, M., Pontieri, V., Pedro, M. A., Bassi, E., Tucci, P. J., & Laurindo, F. R. (2007). Platelet-derived exosomes from septic shock patients induce myocardial dysfunction. *Critical Care*, 11(6), R120.
- Baker, L. D., Frank, L. L., Foster-Schubert, K., Green, P. S., Wilkinson, C. W., McTiernan, A., Cholerton, B. A., Plymate, S. R., Fishel, M. A., Watson, G. S., Duncan, G. E., Mehta, P. D. & Craft, S. (2010). Aerobic exercise improves cognition for older adults with glucose intolerance, a risk factor for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 22(2), 569-579.
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., Jones, E. (2011). Alzheimer's Disease. *The Lancet*, 377(9770): 1019-1031.
- Ballesteros, S., Mayas, J., Prieto, A., Toril, P., Pita, C., de León Laura, P., Reales, J.M & Waterworth, J. A. (2015). A randomized controlled trial of brain training with non-action video games in older adults: results of the 3-month follow-up. *Frontiers in aging neuroscience*, 7.
- Bar-Am, O., Amit, T., Kupersmidt, L., Aluf, Y., Mechlovich, D., Kabha, H., ... & Weinreb, O. (2015). Neuroprotective and neurorestorative activities of a novel iron chelator-brain selective monoamine oxidase -A/monoamine oxidase -B inhibitor in animal models of Parkinson's disease and aging. *Neurobiology of aging*, 36(3), 1529-1542.

- Baune BT, Ponath G, Rothermundt M, Riess O, Funke H, Berger K (2008b) Association between genetic variants of IL-1 β , IL-6 and TNF- α cytokines and cognitive performance in the elderly general population of the MEMO-study. *Psychoneuroendocrinology* 33:68-76.
- Beal, M. F. (2005). Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of neurology*, 58(4), 495-505.
- Bellingham, S. A., Guo, B., Coleman, B., & Hill, A. F. (2012). Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Frontiers in physiology*, 3, 124.
- Bence, N. F.; Sampat, R. M.; Kopito, R. R. (2001). Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292:1552-1555.
- Benetti, F., Furini, C. R. G., de Carvalho Myskiw, J., Provensi, G., Passani, M. B., Baldi, E., ... & Blandina, P. (2015). Histamine in the basolateral amygdala promotes inhibitory avoidance learning independently of hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(19), E2536-E2542.
- Bertoldi, K., Spindler, C., dos Santos Moysés, F., Vanzella, C., Lovatel, G. A., Elsner, V. R., Rodrigues, M.A.S & Siqueira, I. R. (2012). Effect of landfill leachate on oxidative stress of brain structures and liver from rodents: modulation by photoelectrooxidation process. *Ecotoxicology and environmental safety*, 84, 319-324.
- Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288), 529-535.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., ... & Nelson, N. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour necrosis factor -R from cells. *Nature*, 385(6618), 729-733.
- Blake, M. R., Holbrook, S. D., Kotwica-Rolinska, J., Chow, E. S., Kretzschmar, D., & Giebultowicz, J. M. Manipulations of amyloid precursor protein cleavage disrupt the circadian clock in aging *Drosophila*. *Neurobiology of disease* (2015) 77, 117-126.
- Bour, A., Little, S., Dodart, J. C., Kelche, C., & Mathis, C. (2004). A secreted form of the β -amyloid precursor protein (sAPP 695) improves spatial recognition memory in OF1 mice. *Neurobiology of learning and memory*, 81(1), 27-38.
- Bossy-Wetzler, E., Schwarzenbacher, R., & Lipton, S. A. (2004). Molecular pathways to neurodegeneration.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:218-254.
- Brites, D., & Fernandes, A. (2015). Neuroinflammation and depression: microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9.
- Brooks, G. A., & White, T. P. (1978). Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *Journal of applied physiology*, 45(6), 1009-1015.
- Brunk, U. T., & Terman, A. (2002a). Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), 611-619.
- Brunk, U. T., & Terman, A. (2002b). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *European Journal of Biochemistry*, 269, 1996-2002.
- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 30-40.
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., ... & Black, R. A. (1998). Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *Journal of Biological Chemistry*, 273(43), 27765-27767.
- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 222-230.

- Caradec, J., Kharmate, G., Hosseini-Beheshti, E., Adomat, H., Gleave, M., & Guns, E. (2014). Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. *Clinical biochemistry*, 47(13), 1286-1292.
- Cechetti, F., Fochesatto, C., Scopel, D., Nardin, P., Gonçalves, C. A., Netto, C. A., & Siqueira, I. R. (2008) Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. *Brain research*, 1188, 182-188.
- Cechinel, L. R., Basso, C. G., Bertoldi, K., Schallenberger, B., de Meireles, L. C. F., & Siqueira, I. R. (2016). Treadmill exercise induces age and protocol-dependent epigenetic changes in prefrontal cortex of Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, 313, 82-87.
- Celsi, F.; Ferri, A.; Casciati, A.; D'Ambrosi, N.; Rotilio, G.; Costa, A., et al. Overexpression of superoxide dismutase 1 protects against beta-amyloid peptide toxicity: effect of estrogen and copper chelators. *Neurochem. Int.* 44:25–33; 2004
- Censo, 2010; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística,
- Chang, C., Lang, H., Geng, N., Wang, J., Li, N., & Wang, X. (2013). Exosomes of BV-2 cells induced by alpha-synuclein: important mediator of neurodegeneration in PD. *Neuroscience letters*, 548, 190-195.
- Chmátalová, Z., Vyhnálek, M., Laczó, J., Hort, J., & Skoumalová, A. (2016). Analysis of lipophilic fluorescent products in blood of Alzheimer's disease patients. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20, 1367-1372.
- Chow V, Mattson M, Wong P, Gleichmann M (2010) An Overview of APP Processing Enzymes and Products. *Neuromolecular Medicine* 12:1-12.
- Cotman, C. W., & Berchtold, N. C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in neurosciences*, 25(6), 295-301.
- Cvecka, J., Tirpakova, V., Sedliak, M., Kern, H., Mayr, W., & Hamar, D. (2015). Physical activity in elderly. *European journal of translational myology*, 25(4), 249.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 52(4), 601-623.
- da Silva, M. D. G., & Boemer, M. R. (2009). Vivendo o envelhecer: uma perspectiva fenomenológica. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 17(3), 380-386.
- Dasuri, K., Zhang, L., & Keller, J. N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 170-185.
- Deleidi, M., Jäggle, M., & Rubino, G. (2015). Immune aging, dysmetabolism, and inflammation in neurological diseases. *Frontiers in neuroscience*, 9, 172.
- Di Loreto S, Falone S, D'Alessandro A, Santini Jr S, Sebastiani P, Cacchio M, Amicarelli F (2014) Regular and moderate exercise initiated in middle age prevents age-related amyloidogenesis and preserves synaptic and neuroprotective signaling in mouse brain cortex. *Experimental Gerontology* 57:57-65.
- Dmitrieva, E. S., Gel'man, V., Zaitseva, K. A., & Lan'ko, S. V. (2006). Age-related changes in the relationship between learning progress and auditory working memory characteristics. *Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni IP Pavlova*, 57(3), 268-275.
- dos Santos Moysés, F., Bertoldi, K., Spindler, C., Sanches, E. F., Elsner, V. R., Rodrigues, M. A. S., & Siqueira, I. R. (2014). Exposition to tannery wastewater did not alter behavioral and biochemical parameters in Wistar rats. *Physiology & behavior*, 129, 160-166.
- dos Santos Sant'Anna, G., Elsner, V. R., Moysés, F., Cechinel, L. R., Lovatel, G. A., & Siqueira, I. R. (2013). Histone deacetylase activity is altered in brain areas from aged rats. *Neuroscience letters*, 556, 152-154.
- Driver, A. S., Kodavanti, P. R. S., & Mundy, W. R. (2000). Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicology and teratology*, 22(2), 175-181.

- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Elsner, V. R., Lovatel, G. A., Bertoldi, K., Vanzella, C., Santos, F. M., Spindler, C., Almeida, E., F., Nardin, P. & Siqueira, I. R. Effect of different exercise protocols on histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in rat hippocampus. *Neuroscience*, (2011), 192, 580-587.
- Elsner, V. R., Lovatel, G. A., Moysés, F., Bertoldi, K., Spindler, C., Cechinel, L. R., Muotri, A., R. & Siqueira, I. R. Exercise induces age-dependent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: a preliminary study. *Experimental gerontology*, (2013), 48(2), 136-139.
- Erickson, C. A., & Barnes, C. A. (2003). The neurobiology of memory changes in normal aging. *Experimental gerontology*, 38(1), 61-69.
- Erickson, K. I., Miller, D. L., Weinstein, A. M., Akl, S. L., & Banducci, S. (2012). Physical activity and brain plasticity in late adulthood: a conceptual and comprehensive review. *Ageing Research*, 3(1), 6.
- Fabel, K., Fabel, K., Tam, B., Kaufer, D., Baiker, A., Simmons, N., Kuo, C.J. & Palmer, T. D. (2003). VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 18(10), 2803-2812.
- Farmer, J., Zhao, X. V., Van Praag, H., Wodtke, K., Gage, F. H., & Christie, B. R. (2004). Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague–Dawley rats in vivo. *Neuroscience*, 124(1), 71-79.
- Farrall, A. J., & Wardlaw, J. M. (2009). Blood–brain barrier: ageing and microvascular disease–systematic review and meta-analysis. *Neurobiology of aging*, 30(3), 337-352.
- Fatouros, I. G., Jamurtas, A. Z., Villiotou, V., Pouliopoulou, S., Fotinakis, P., Taxildaris, K & Deliconstantinos, G. (2004). Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Medicine and science in sports and exercise*, 36, 2065-2072.
- Fernandes, J., Baliego, L. G. Z., Peixinho-Pena, L. F., de Almeida, A. A., Venancio, D. P., Scorza, F. A., de Mello, M. T., & Arida, R. M. (2013). Aerobic exercise attenuates inhibitory avoidance memory deficit induced by paradoxical sleep deprivation in rats. *Brain research*, 1529, 66-73.
- Ferreira, A. L. A., & Matsubara, L. S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43(1), 61-68.
- Fevrier, B., & Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current opinion in cell biology*, 16(4), 415-421.
- Fiandaca, M. S., Kapogiannis, D., Mapstone, M., Boxer, A., Eitan, E., Schwartz, J. B., ... & Goetzl, E. J. (2015). Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimer's & Dementia*, 11(6), 600-607.
- Findley LJ. The economic impact of Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*. 2007; 13 (Suppl.):S8–S12
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247.
- Fiore M, Probert L, Kollias G, Akassoglou K, Alleva E, Aloe L (1996) Neurobehavioral Alterations in Developing Transgenic Mice Expressing TNF- α in the Brain. *Brain, Behavior, and Immunity* 10:126-138.
- Flood FM, Cowburn RF, Johnston JA (1997) Presenilin-1, amyloid precursor protein and amyloid precursor-like protein 2 mRNA levels in human superior frontal cortex during aging. *Neuroscience Letters* 235:17-20.
- Fraile-Bermúdez, A. B., Kortajarena, M., Zarrazquin, I., Maquibar, A., Yanguas, J. J., Sánchez-Fernández, C. E., Gil, J., Irazusta, A & Ruiz-Litago, F. (2015). Relationship

- between physical activity and markers of oxidative stress in independent community-living elderly individuals. *Experimental gerontology*, 70, 26-31.
- Fröhlich, D., Kuo, W. P., Frühbeis, C., Sun, J. J., Zehendner, C. M., Luhmann, H. J., Pinto, S., Toedling, J., Trotter, J. & Krämer-Albers, E. M. (2014) Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 369(1652), 1-13.
- Frühbeis, C., Helmig, S., Tug, S., Simon, P., & Krämer-Albers, E. M. (2015) Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *Journal of extracellular vesicles*, 4, 1-11.
- Fukumoto H, Rosene DL, Moss MB, Raju S, Hyman BT, Irizarry MC (2004) β -Secretase Activity Increases with Aging in Human, Monkey, and Mouse Brain. *The American Journal of Pathology* 164:719-725.
- Fukui, H., & Moraes, C. T. (2008). The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis? *Trends in neurosciences*, 31(5), 251-256.
- Gambim, M. H., Do Carmo, A. D. O., Marti, L., Veríssimo-Filho, S., Lopes, L. R., & Janiszewski, M. Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Critical Care*, (2007), 11(5), R107.
- Girouard, H., & Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of Applied Physiology*, 100(1), 328-335.
- Glisky, E. L. (2007). Changes in cognitive function in human aging. *Brain aging: models, methods, and mechanisms*, 3-20.
- Goh, J. O. (2011). Functional dedifferentiation and altered connectivity in older adults: neural accounts of cognitive aging. *Aging and disease*, 2(1), 30.
- Gomes, C., Keller, S., Altevogt, P., & Costa, J. (2007). Evidence for secretion of Cu, Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*, 428(1), 43-46.
- Gupta, A., & Pulliam, L. (2014). Exosomes as mediators of neuroinflammation. *J Neuroinflammation*, 11(1), 68.
- Haider, S., Saleem, S., Perveen, T., Tabassum, S., Batool, Z., Sadir, S., ... & Madiha, S. (2014). Age-related learning and memory deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and changes in antioxidant defense system. *Age*, 36(3), 1291-1302.
- Halliwell B (1975) The superoxide dismutase activity of iron complexes. *FEBS lett*, 56(1), 34-38.
- Halliwell, B., & Cross, C. E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*, 102(Suppl 10), 5.
- Halliwell B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685-716.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we know? *Journal of neurochemistry*, 97(6), 1634-1658.
- Hammeren, J., Powers, S., Lawler, J., Criswell, D., Martin, D., Lowenthal, D., & Pollock, M. (1992) Exercise training-induced alterations in skeletal muscle oxidative and antioxidant enzyme activity in senescent rats. *International journal of sports medicine*, 13(5), 412-416.
- Haney, M. J., Zhao, Y., Harrison, E. B., Mahajan, V., Ahmed, S., He, Z., ... & Gendelman, H. E. (2013). Specific transfection of inflamed brain by macrophages: a new therapeutic strategy for neurodegenerative diseases. *PloS one*, 8(4), e61852.
- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry, *J. Gerontol*, 11, 298-300.

- Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 257-266.
- Harper, D. G., Volicer, L., Stopa, E. G., McKee, A. C., Nitta, M., & Satlin, A. (2005). Disturbance of endogenous circadian rhythm in aging and Alzheimer disease. *The American journal of geriatric psychiatry*, 13(5), 359-368.
- Hartley, D. M., Walsh, D. M., Chianping, P. Y., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P. M., & Selkoe, D. J. (1999). Protofibrillar intermediates of amyloid β -protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *The Journal of neuroscience*, 19(20), 8876-8884.
- Hartmann, D., De Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lubke, T., Illert, A. L., von Figura, K. & Saftig, P. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for α -secretase activity in fibroblasts. *Human molecular genetics*, 11(21), 2615-2624.
- Hook V, Schechter I, Demuth H-U, Hook G (2008) Alternative pathways for production of β -amyloid peptides of Alzheimer's disease. In: *Biological Chemistry*, 389, 993-1006.
- Hu K, Van Someren EJ, Shea SA, & Scheer FA. (2009) Reduction of scale invariance of activity fluctuations with aging and Alzheimer's disease: Involvement of the circadian pacemaker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(8), 2490-2494.
- Hurd, M. D., Martorell, P., Delavande, A., Mullen, K. J., & Langa, K. M. (2013). Monetary costs of dementia in the United States. *New England Journal of Medicine*, 368(14), 1326-1334.
- Ilic, T. V., Jovanovic, M., Jovicic, A., & Tomovic, M. (1998). Oxidative stress indicators are elevated in de novo Parkinson's disease patients. *Functional neurology*, 14(3), 141-147.
- Janiszewski M, Carmo AO, Pedro MA, Silva E, Knobel E, Laurindo FR (2004) Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: a novel vascular redox pathway. *Crit Care Medicine*, 32:818-825.
- Jansen, F., Yang, X., Franklin, B. S., Hoelscher, M., Schmitz, T., Bedorf, J., Nickening, G. & Werner, N. (2013) High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovascular research*, 98(1), 94-106.
- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 53(S3), S26-S38.
- Johnstone, R. M., Mathew, A., Mason, A. B., & Teng, K. (1991). Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *Journal of cellular physiology*, 147(1), 27-36.
- Jolitha, A. B., Subramanyam, M. V. V., & Devi, S. A. (2009) Age-related responses of the rat cerebral cortex: influence of vitamin E and exercise on the cholinergic system. *Biogerontology*, 10(1), 53-63.
- Kalra, J., Rajput, A. H., Mantha, S. V., & Prasad, K. (1992). Serum antioxidant enzyme activity in Parkinson's disease. *Molecular and cellular biochemistry*, 110(2), 165-168.
- Kanninen, K. M., Bister, N., Koistinaho, J., & Malm, T. Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, (2015), 1862(3), 402-410.
- Kawamoto, E. M., Munhoz, C. D., Glezer, I., Bahia, V. S., Caramelli, P., Nitrini, R., ... & Marcourakis, T. (2005). Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 26(6), 857-864.
- Kerr AL, Steuer, E. L., Pochtarev, V., Swain, R. A. (2010) Angiogenesis but not neurogenesis is critical for normal learning and memory acquisition. *Neuroscience*, 171:214-26.
- Kim, G., & Kim, E. (2013) Effects of treadmill training on limb motor function and acetylcholinesterase activity in rats with stroke. *Journal of physical therapy science*, 25(10), 1227.

- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental neurobiology*, 24(4), 325-340.
- Kirk-Sanchez, N. J., & McGough, E. L. (2014). Physical exercise and cognitive performance in the elderly: current perspectives. *Clin Interv Aging*, 9, 51-62.
- Kocatürk, P. A., Akbostanci, M. C., Tan, F., & Kavas, G. Ö. (2000). Superoxide dismutase activity and zinc and copper concentrations in Parkinson's disease. *Pathophysiology*, 7(1), 63-67.
- Kourembanas, S. (2015). Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annual review of physiology*, 77, 13-27.
- Lakhal, S., & Wood, M. J. Exosome nanotechnology: an emerging paradigm shift in drug delivery. *Bioessays*, (2011), 33, 737-741.
- Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *The FASEB journal*, 11(2), 118-124.
- LeBel, C. P., Ali, S. F., McKee, M., & Bondy, S. C. (1990). Organometal-induced increases in oxygen reactive species: the potential of 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate as an index of neurotoxic damage. *Toxicology and applied pharmacology*, 104(1), 17-24.
- Lecointre, M., Vézier, C., Bénard, M., Ramdani, Y., Dupré, N., Brasse-Lagnel, C., ... & Jégou, S. (2015). Age-dependent alterations of the NMDA receptor developmental profile and adult behavior in postnatally ketamine-treated mice. *Developmental neurobiology*, 75(3), 315-333.
- Lee, H. J., Suk, J. E., Patrick, C., Bae, E. J., Cho, J. H., Rho, S., ... & Lee, S. J. (2010). Direct transfer of α -synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *Journal of Biological Chemistry*, 285(12), 9262-9272.
- Lehmann, B. D., Paine, M. S., Brooks, A. M., McCubrey, J. A., Renegar, R. H., Wang, R., & Terrian, D. M. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer research*, 68(19), 7864-7871.
- Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440(7082), 352-357.
- Lima-Costa, M. F & Veras, R. (2003) Saúde pública e envelhecimento. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 19, n. 3, p. 700-701, ISSN 0102-311X.
- Lin T-W, Shih Y-H, Chen S-J, Lien C-H, Chang C-Y, Huang T-Y, Chen S-H, Jen CJ, Kuo Y-M (2015) Running exercise delays neurodegeneration in amygdala and hippocampus of Alzheimer's disease (APP/PS1) transgenic mice. *Neurobiology of Learning and Memory* 118:189-197.
- Liu J & Mori A (1993) Age-associated changes in superoxide dismutase activity, thiobarbituric acid reactivity and reduced glutathione level in the brain and liver in senescence accelerated mice (SAM): a comparison with ddY mice. *Mechanism of Ageing and Development*, 71(1), 23-30.
- Liu, H. L., Zhao, G., & Zhang, H. (2013). Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice. *Behavioural brain research*, 256, 261-272.
- Lovatel, G. A., Bertoldi, K., Elsner, V. R., Vanzella, C., dos Santos Moysés, F., Spindler, C., Funck, V. R., Pereira, L. M., de Oliveira, C. V., Netto, C. A., Siqueira, I. R. (2012). Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function. *Neurobiology of learning and memory*, 98(2), 182-187.
- Lovatel, G. A., Elsner, V. R., Bertoldi, K., Vanzella, C., dos Santos Moysés, F., Vizuete, A., Spindler, C., Cechinel, L. R., Netto, C. A., Muotri, A.R. & Siqueira, I. R. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiology of learning and memory*, (2013), 101, 94-102.
- Martinez-Martín, P., Rodríguez-Blázquez, C., Paz, S., Forjaz, M. J., Frades-Payo, B., Cubo, E., Pedro-Cuesta, J. & Lizán, L. (2015). Parkinson Symptoms and Health Related

- Quality of Life as Predictors of Costs: A Longitudinal Observational Study with Linear Mixed Model Analysis. *PloS one*, 10(12), e0145310.
- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K.E., Bateman, R. J. (2010). Decreased clearance of CNS β -amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, 330(6012), 1774-1774.
- McLean CA, Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., Masters, C.L. (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 46:860-866.
- McReynolds, J. R., Anderson, K. M., Donowho, K. M., & McIntyre, C. K. (2014). Noradrenergic actions in the basolateral complex of the amygdala modulate Arc expression in hippocampal synapses and consolidation of aversive and non-aversive memory. *Neurobiology of learning and memory*, 115, 49-57.
- Minciullo, P. L., Catalano, A., Mandraffino, G., Casciaro, M., Crucitti, A., Maltese, G., Morabito, N., Lasco, A., Gangemi, S. & Basile, G. (2015). Inflammaging and Anti-Inflammaging: The Role of Cytokines in Extreme Longevity. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 1-16.
- Morley JE, & Farr SA (2014) The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochemical pharmacology*, 88(4), 479-485.
- Morrison, J. H., & Baxter, M. G. (2012). The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(4), 240-250.
- Moss, M. L., Jin, S. L. C., Milla, M. E., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., & Kost, T. A. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α , *Nature*, 385, 733-736.
- Motta M, Malaguarnera M, Ferrari E et al (2007) Genealogy of Centenarians and their relatives: a study of 12 families. *Archives Gerontology Geriatrics* 45:97-102.
- Mura E, Zappettini S, Preda S, Biundo F, Lanni C, Grilli M, Cavallero A, Olivero G, Salamone A, Govoni S, Marchi M (2012) Dual Effect of Beta-Amyloid on $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptors Controlling the Release of Glutamate, Aspartate and GABA in Rat Hippocampus. *Plos One*, 7(1): 29661.
- Murakami, K.; Murata, N.; Noda, Y.; Tahara, S.; Kaneko, T.; Kinoshita, N., (2001) SOD1 (copper/zinc superoxide dismutase) deficiency drives amyloid beta protein oligomerization and memory loss in mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Biological and Chemistry*, 286:44557-44568.
- Neeper, S. A., Gómez-Pinilla, F., Choi, J., & Cotman, C. W. (1996). Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. *Brain research*, 726(1), 49-56.
- Nicita-Mauro, V., Balbo, C. L., Mento, A., Nicita-Mauro, C., Maltese, G., & Basile, G. (2008). Smoking, aging and the centenarians. *Experimental gerontology*, 43(2), 95-101.
- Nunan, J., & Small, D. H. (2000). Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases. *FEBS letters*, 483(1), 6-10.
- Oh H, Mormino EC, Madison C, Hayenga A, Smiljic A, Jagust W.J. (2011) β -Amyloid affects frontal and posterior brain networks in normal aging. *Neuroimage*. 54(3), 1887-1895.
- World Health Organization, (2011) ORGANIZATION, W. H. Global health and aging.
- Perez-Gonzalez, R., Gauthier, S. A., Kumar, A., & Levy, E. (2012). The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 43108-43115.
- Pietri M, Dakowski C, Hannaoui S, Alleaume-Butaux A, Hernandez-Rapp J, Ragagnin A, Mouillet-Richard S, Haik S, Bailly Y, Peyrin JM, Launay JM, Kellermann O, & Schneider B (2013) PDK1 decreases TACE-mediated [alpha]-secretase activity and promotes disease progression in prion and Alzheimer's diseases. *Nature medicine*, 19(9), 1124-1131.

- Praticò, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2001). Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *The Journal of neuroscience*, 21(12), 4183-4187.
- Price, D. L., Borchelt, D. R., & Sisodia, S. S. (1993). Alzheimer disease and the prion disorders amyloid beta-protein and prion protein amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6381-6384.
- Quindry, J., French, J., Hamilton, K., Lee, Y., Mehta, J. L., & Powers, S. (2005). Exercise training provides cardioprotection against ischemia-reperfusion induced apoptosis in young and old animals. *Experimental gerontology*, 40(5), 416-425.
- Radák, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucsok, J., Sasvári, M., Nyakas, C. & Goto, S. (2001). Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemistry international*, 38(1), 17-23.
- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., & Simons, K. (2006). Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11172-11177.
- Rajendran L, Bali J, Barr MM, Krämer-Albers EM, Picou F, Raposo G, van der Vos KE, van Niel G, Wang J, Breakefield XO. (2014) Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system. *The Journal of Neuroscience*. 34(46):15482-9.
- Rando, T. A. (2006). Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*, 441(7097), 1080-1086.
- Rao, S. K., Ross, J. M., Harrison, F. E., Bernardo, A., Reiserer, R. S., Reiserer, R. S., Mobley, J. A & McDonald, M. P. (2015). Differential proteomic and behavioral effects of long-term voluntary exercise in wild-type and APP-overexpressing transgenics. *Neurobiology of disease*, 78, 45-55.
- Reis, J. S., Veloso, C. A., Mattos, R. T., Purish, S., & Nogueira-Machado, J. A. (2008). Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52(7), 1096-1105.
- Rejeski, W. J., & Mihalko, S. L. (2001). Physical activity and quality of life in older adults. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 56(suppl 2), 23-35.
- Samadi, A., Estrada, M., Pérez, C., Rodríguez-Franco, M. I., Iriepa, I., Moraleda, I., Chioua, M. & Marco-Contelles, J (2012) Pyridonepezils, new dual AChE inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease: Synthesis, biological assessment, and molecular modeling. *European journal of medicinal chemistry*, 57, 296-301.
- Sánchez-Alavez M, Chan SL, Mattson MP, Criado JR (2007) Electrophysiological and cerebrovascular effects of the α -secretase-derived form of amyloid precursor protein in young and middle-aged rats. *Brain Research* 1131:112-117.
- Sastre, M., Walter, J., & Gentleman, S. M. (2008). Interactions between APP secretases and inflammatory mediators. *J Neuroinflammation*, 5, 25.
- Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J., & Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*, 267(16), 4904-4911.
- Scopel, D., Fochesatto, C., Cimarosti, H., Rabbo, M., Belló-Klein, A., Salbego, C., Netto, C. A. & Siqueira, I. R. (2006) Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain research bulletin*, 71(1), 155-159.
- Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, & Benedikz E (2000) Levels of α and β -secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neuroscience letters*, 278(3), 169-172.
- Shefer G, Rauner G, Yablonka-Reuveni Z, Benayahu D. (2010) Reduced satellite cell numbers and myogenic capacity in aging can be alleviated by endurance exercise. *PLoS One*; 5: 13307.
- Sies, H. (1985). Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. *Oxidative stress*, 73-90

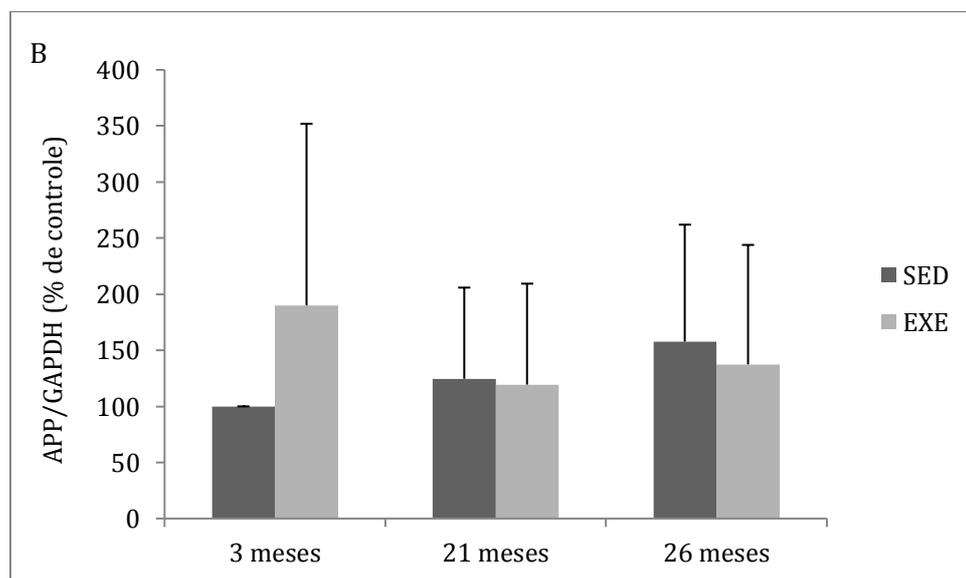
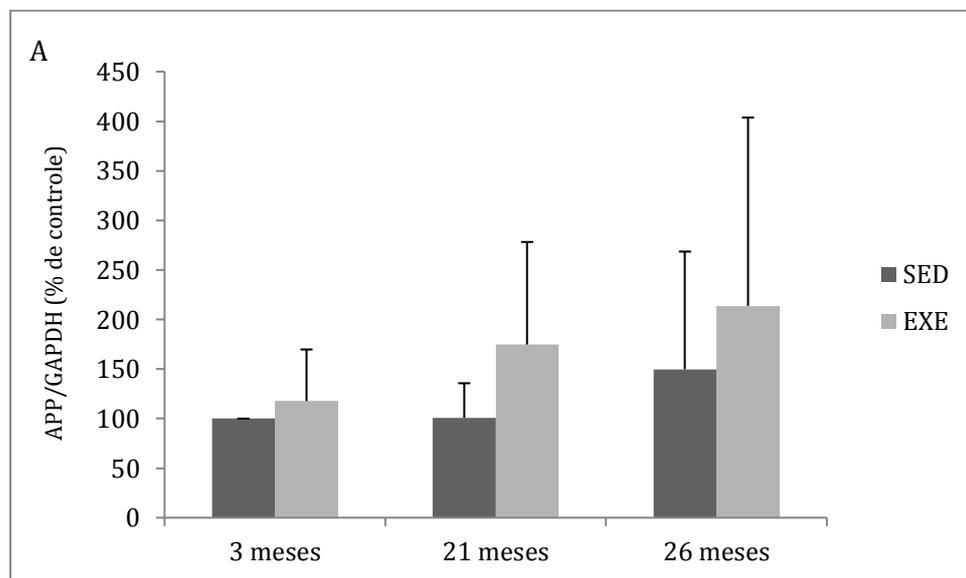
- Siqueira, I. R., Fochesatto, C., de Andrade, A., Santos, M., Hagen, M., Bello-Klein, A., & Netto, C. A. (2005). Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *International journal of developmental neuroscience*, 23(8), 663-671.
- Simpson, R. J., Jensen, S. S., & Lim, J. W. (2008). Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, 8(19), 4083-4099.
- Sinha, M., Bir, A., Banerjee, A., Bhowmick, P., & Chakrabarti, S. (2016). Multiple mechanisms of age-dependent accumulation of amyloid beta protein in rat brain: Prevention by dietary supplementation with N-acetylcysteine, α -lipoic acid and α -tocopherol. *Neurochemistry international*, 95, 92-99.
- Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Curry, W. T., Carter, B. S., Krichevsky, A. M. & Breakefield, X. O. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*, 10(12), 1470-1476.
- Solas M, Aisa B, Mugueta MC, Del Río J, Tordera RM, Ramírez MJ. Interactions Between Age, Stress and Insulin on Cognition: Implications for Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacol* (2010); 35:1664-1673.
- Spindler, C., Cechinel, L. R., Basso, C., Moysés, F., Bertoldi, K., Roesler, R., Lovatel, G. A., Elsner, V. R. & Siqueira, I. R. (2014) Treadmill exercise alters histone acetyltransferases and histone deacetylases activities in frontal cortices from wistar rats. *Cellular and molecular neurobiology*, 34(8), 1097-1101.
- Stein, C., Hopfeld, J., Lau, H., & Klein, J. (2015). Effects of Ginkgo biloba Extract EGb 761, Donepezil and their Combination on Central Cholinergic Function in Aged Rats. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 18(4), 634-646.
- Stranahan AM (2012). Chronobiological approaches to Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 9(1), 93-98.
- Tabner, B. J., Turnbull, S., Fullwood, N. J., German, M., & Allsop, D. (2005a). The production of hydrogen peroxide during early-stage protein aggregation: a common pathological mechanism in different neurodegenerative diseases? *Biochemical Society Transactions*, 33(4), 548-550.
- Tabner, B. J., El-Agnaf, O. M., Turnbull, S., German, M. J., Paleologou, K. E., Hayashi, Y., ... & Allsop, D. (2005b). Hydrogen peroxide is generated during the very early stages of aggregation of the amyloid peptides implicated in Alzheimer disease and familial British dementia. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43), 35789-35792.
- Tachida Y, Nakagawa K, Saito T, Saido TC, Honda T, Saito Y, Murayama S, Endo T, Sakaguchi G, Kato A, Kitazume S, Hashimoto Y (2008) Interleukin-1 β up-regulates TACE to enhance α -cleavage of APP in neurons: resulting decrease in A β production. *Journal of Neurochemistry* 104:1387-1393.
- Takahashi H, Fukumoto H, Maeda R, Terauchi J, Kato K, Miyamoto M (2010) Ameliorative effects of a non-competitive BACE1 inhibitor TAK-070 on A β peptide levels and impaired learning behavior in aged rats. *Brain Research* 1361:146-156.
- Taylor, C. J., Ireland, D. R., Ballagh, I., Bourne, K., Marechal, N. M., Turner, P. R., Bilkey, D. K., Tate, W. P. & Abraham, W. C. (2008). Endogenous secreted amyloid precursor protein- α regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiology of disease*, 31(2), 250-260.
- Terman, A., & Brunk, U. T. (2004). Aging as a catabolic malfunction. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12), 2365-2375.
- Tickner, J. A., Urquhart, A. J., Stephenson, S. A., Richard, D. J., & O'Byrne, K. J. (2014). Functions and therapeutic roles of exosomes in cancer. *Front Oncol*, 4(127.10), 3389.
- Trejo, J. L., Carro, E., & Torres-Alemán, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 21(5), 1628-1634.

- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Progress in neurobiology*, 70(1), 1-32.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
- Vaccari, R. J. P., Brand, F., Adamczak, S., Lee, S. W., Perez-Barcena, J., Wang, M. Y., ... & Keane, R. W. (2015). Exosome-mediated inflammasome signaling after central nervous system injury. *Journal of neurochemistry*.
- Van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience*, 2(3), 266-270.
- Van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., & Gage, F. H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13427-13431
- Van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., & Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of neuroscience*, 25(38), 8680-8685.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., & Luo, Y. (1999). β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286(5440), 735-741.
- Xu, D., & Tahara, H. (2013). The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Advanced drug delivery reviews*, 65(3), 368-375.
- Xu Z-Q, Zhang L-Q, Wang Q, Marshall C, Xiao N, Gao J-Y, Wu T, Ding J, Hu G, Xiao M (2013) Aerobic Exercise Combined with Antioxidative Treatment does not Counteract Moderate- or Mid-Stage Alzheimer-Like Pathophysiology of APP/PS1 Mice. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 19:795-803.
- Waldhauser, F., Weiszenbacher, G., Tatzer, E., Gisinger, B., Waldhauser, M., Schemper, M., & Frisch, H. (1988) Alterations in Nocturnal Serum Melatonin Levels In Humans With Growth and Aging. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 66(3), 648-652.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid [beta] protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416:535-539.
- Wannamethee SG, Shaper AG, Walker M. (1998) Changes in physical activity, mortality, and incidence of coronary heart disease in older men. *Lancet*. 351:1603-8.
- Weinreb, O., Amit, T., Bar-Am, O., & Youdim, M. B. (2015). Neuroprotective effects of multifaceted hybrid agents targeting MAO, cholinesterase, iron and β -amyloid in ageing and Alzheimer's disease. *British journal of pharmacology*.
- WHO. (2007) A guide for population-based approaches to increasing levels of physical activity: implementation of the WHO Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health.
- Yang, F. C., & Liang, K. C. (2014). Interactions of the dorsal hippocampus, medial prefrontal cortex and nucleus accumbens in formation of fear memory: difference in inhibitory avoidance learning and contextual fear conditioning. *Neurobiology of learning and memory*, 112, 186-194.
- Yang, R. Y., Zhao, G., Wang, D. M., Pang, X. C., Wang, S. B., Fang, J. S., & Du, G. H. (2015) DL0410 can reverse cognitive impairment, synaptic loss and reduce plaque load in APP/PS1 transgenic mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 139, 15-26.
- Yankner, B. A., Lu, T., & Loerch, P. (2008). The aging brain. *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.*, 3, 41-66.
- Ypsilanti, A. R., da Cruz, M. T. G., Burgess, A., & Aubert, I. (2008) The length of hippocampal cholinergic fibers is reduced in the aging brain. *Neurobiology of aging*, 29(11), 1666-1679.

- Yu F, Xu B, Song C, Ji L, Zhang X (2013) Treadmill exercise slows cognitive deficits in aging rats by antioxidation and inhibition of amyloid production. *NeuroReport* 24:342-347.
- Yun, S. H., Gamkrelidze, G., Stine, W. B., Sullivan, P. M., Pasternak, J. F., LaDu, M. J., & Trommer, B. L. (2006). Amyloid-beta 1-42 reduces neuronal excitability in mouse dentate gyrus. *Neuroscience letters*, 403(1), 162-165.
- Yuyama, K., Sun, H., Usuki, S., Sakai, S., Hanamatsu, H., Mioka, T., Kimura, N., Okada, M., Tahara, H., Furukawa, J., Fujitani, N., Shinohara, Y., Igarashi, Y. & Fujitani, N. (2015). A potential function for neuronal exosomes: Sequestering intracerebral amyloid- β peptide. *FEBS letters*, 589(1), 84-88.
- Zeevalk, G. D., Bernard, L. P., Song, C., Gluck, M., & Ehrhart, J. (2005). Mitochondrial inhibition and oxidative stress: reciprocating players in neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling*, 7(9-10), 1117-1139.
- Zhao G, Liu HL, Zhang H, & Tong XJ (2015) Treadmill exercise enhances synaptic plasticity, but does not alter β -amyloid deposition in hippocampi of aged APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience*, 298, 357-366.
- Zheng, M., & Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochemical pharmacology*, 59(1), 1-6.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950.

ANEXO I

Resultados do conteúdo de APP em hipocampo de ratos de 3, 21 e 26 meses de idade.



Efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre o conteúdo de APP hipocampal em ratos Wistar de 3, 21 e 26 meses de idade. As colunas representam a média \pm desvio padrão (% de controle). Figura A, grupos 1 hora após a última sessão de exercício, Figura B, grupos 18 horas após a última sessão de exercício.

ANEXO II

Gel correspondente ao conteúdo de APP hipocampal em ratos Wistar de 3, 21 e 26 meses de idade.

