



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM



RAMON ALVES PIRES

**Análise temporal da dinâmica mitocondrial e balanço redox induzida por
diferentes protocolos de exercício físico**

VITÓRIA DA CONQUISTA - BA

2019

RAMON ALVES PIRES

**ANÁLISE TEMPORAL DA DINÂMICA MITOCONDRIAL E BALANÇO
REDOX INDUZIDA POR DIFERENTES PROTOCOLOS DE
EXERCÍCIO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Rafael Pereira de Paula

Co-orientadora: Dr^a. Alicia Juliana Kowaltowski

**VITÓRIA DA CONQUISTA - BA
2019**

TERMO DE DEFESA

RAMON ALVES PIRES

**ANÁLISE TEMPORAL DA DINÂMICA MITOCONDRIAL E BALANÇO
REDOX INDUZIDA POR DIFERENTES PROTOCOLOS DE
EXERCÍCIO FÍSICO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular)

03 de Outubro de 2019

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Rafael Pereira de Paula
Departamento de Ciências Naturais
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Raildo da Silva Coqueiro
Departamento de Saúde
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. José Ailton Oliveira Carneiro
Departamento de Saúde
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

AGRADECIMENTOS

Agradeço, à Deus e à Nossa Senhora, por estarem sempre comigo, guiando meus passos e abençoando-me com cada vitória alcançada. Obrigado por me darem fé e a força necessária para lutar e enfrentar todos obstáculos sem nunca desistir;

Ao meu orientador Rafael Pereira pelo seu grande apoio, dedicação, orientação e ensinamentos que transcendem a relação orientando/orientador. Sempre o terei como referência profissional e exemplo de humanidade;

Agradeço aos meus pais e familiares pelo apoio e orações;

De modo mais que especial, à Ludi, pela imensa paciência nos dias mais complicados e pelo apoio infindável, compreendendo que este projeto era um desejo imenso que queria ver realizado e ela faz parte dessa vitória;

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), ao Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) e ao Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS/UFBA) pela oportunidade de realização de aulas e experimentos do mestrado;

Agradeço a todos os professores do PMBqBM/UESB e do IMS/UFBA pelos conhecimentos que me transmitiram e que foram importantes para o andamento deste trabalho;

À co-orientadora Alcília pelo apoio e direcionamento deste projeto de mestrado;

Agradeço aos colegas do mestrado com os quais a partilha de saberes e “resenhas” fizeram este percurso ganhar um especial encanto. E de modo especial agradeço aos colegas Leonardo e Felipe que sempre tiveram disponibilidade para ouvirem e esclarecerem as minhas dúvidas e com apoio incondicional tornam o fardo mais leve;

A Thiago, eu agradeço com imenso reconhecimento por sua determinação e sabedoria, você me ensinou muito mais que protocolos experimentais, com sua generosidade você faz o impossível parecer fácil. Muito Obrigado!

Deixo um especial agradecimento à minha prima Amanda, à colega Danielba e todos os amigos Grupo de Pesquisa em Fisiologia Neuromuscular (GPFN), vocês foram fundamentais para concretização deste projeto;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo suporte ao projeto;

Aos animais usados nos experimentos que involuntariamente “doaram” suas vidas, mas que certamente não será em vão;

Agradeço também aos membros desta banca de qualificação por cada sugestão concedida e por aceitarem participar deste momento ímpar em minha trajetória acadêmica.

*“Vou perseguir, tudo aquilo que Deus
já escolheu pra mim”
“Nada e ninguém no mundo vai me
fazer desistir”*

Celina Borges

RESUMO

O exercício físico agudo promove mudanças no potencial bioenergético e balanço redox celular, de tal forma a magnitude do estímulo decorrente de cada protocolo de treinamento é capaz de induzir a expressão de genes envolvidos na morfologia e dinâmica mitocondrial, bem como no balanço redox, ao longo de uma janela temporal de 24 horas após o exercício. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do exercício agudo executado em diferentes protocolos de treino sobre a expressão de genes envolvidos na dinâmica mitocondrial e defesa antioxidante em músculos esqueléticos de camundongos. 65 camundongos machos da linhagem *Swiss* foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: um grupo sedentário (5 animais) e 3 grupos com 20 animais cada, que foram submetidos a protocolos de nado forçado em diferentes formas de execução, aqui representados por BIC (baixa intensidade contínuo), AIC (alta intensidade contínuo) e AII (alta intensidade intervalado). Em tempos específicos (0h, 6h, 12h e 24h) após a conclusão do protocolo de treino, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados e o músculo gastrocnêmio foi retirado para posterior análise da expressão de genes envolvidos nas vias de biogênese (*Pparg1a*), fusão (*Mfn2*) e fissão (*Dnm1L*) mitocondrial, mitofagia (*Park2*), inflamação (*NOS2*) e defesa antioxidante (*Nfe2l2*, *GPx1*). Medidas de TBARS e da atividade das enzimas catalase, glutatona peroxidase (GPx) e citrato sintase (CS) foram realizadas em todas as amostras teciduais (controle, 0h, 6h, 12h e 24h) e medidas da lactacidemia foi realizada apenas nas amostras obtidas imediatamente após o exercício. Foi realizada a comparação entre os grupos (BIC, AIC e AII) e entre os momentos das medidas (controle, 0h, 6h, 12h e 24h) dentro de cada grupo, sendo adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$. A lactacidemia imediatamente após o exercício foi significativamente maior, quanto maior a intensidade do exercício (BIC < AIC < AII), a atividade da enzima CS foi significativamente maior no grupo AII em relação aos demais grupos ao longo das 24h após o exercício. As medidas de TBARS foram significativamente menores no grupo BIC em 0 e 6h, quando comparado aos demais grupos, no grupo AII a medida de TBARS reduziu progressivamente, alcançando valores iguais ao controle em 24h após o exercício, o que não foi observado no grupo AIC, que se manteve com quantidade de TBARS significativamente superior. A atividade das enzimas catalase e GPx foram significativamente maiores em relação ao controle ao longo das 24h pós exercício em todos os grupos, no entanto, apenas o grupo AII apresentou atividade da GPx significativamente maior em relação ao grupo BIC, na medida de 0h, e em relação ao grupo AIC na medida de 24h. Quanto à expressão gênica, apesar de opostos quanto à intensidade e duração do exercício, foi observado um comportamento temporal semelhante na expressão do gene *Pparg1a* nos grupos BIC e AII, com maior expressão em 6 e 24h. O grupo AIC apresentou aumentos significativos apenas em 0h e 6h após o exercício para o gene *Pparg1a*. A expressão do gene *Mfn2* foi significativamente maior em 0h apenas nos grupos de alta intensidade, permanecendo alta em 6h apenas no grupo AII. No que tange os genes envolvidos na fissão mitocondrial e mitofagia, apenas o grupo AII apresentou repressão da expressão dos genes *Dnm1L* e *Park2* ao longo das 24h após o exercício, enquanto o grupo AIC foi o único que apresentou aumento significativo na expressão destes genes quando comparado aos demais grupos. Apenas os grupos de alta intensidade apresentaram aumento significativo da expressão do gene *NOS2*, em 0h no grupo AIC e em 6h no grupo AII. Assim como ocorrido com o gene *Pparg1a*, a expressão do gene *Nfe2l2* demonstrou um comportamento temporal semelhante entre os grupos BIC e AII, com aumento crescente ao longo do tempo, alcançando valores significativamente maiores em 24h. O grupo AIC apresentou aumentos significativos apenas em 0h para o gene *Nfe2l2*. Quanto à expressão do gene *GPx1*, o grupo AIC demonstrou aumento significativo na medida de 0h, enquanto o grupo AII na medida de 24h. Estes resultados reforçam a hipótese de que mudanças nas variáveis intensidade, duração e forma de execução são capazes de modular de forma

diferente a expressão de genes a atividade de enzimas envolvidos na dinâmica mitocondrial e defesa antioxidante. Se considerarmos em conjunto os resultados indicam que o uso de intervalos durante a execução de exercícios de alta intensidade poderia proporcionar condições adequadas para minimizar os sinais de dano oxidativo, especialmente em nível mitocondrial, visto que houve repressão da expressão de genes relacionados a fissão e mitofagia após o protocolo AII, além de potencializar a sinalização para vias de biogênese e fusão mitocondrial, bem com melhora da defesa antioxidante, que em conjunto ajudam a manter a rede mitocondrial e tornam as células musculares mais adaptadas a suportar condições de estresse oxidativo.

Palavras chave: Exercício físico, dinâmica mitocondrial, balanço redox

ABSTRACT

Acute exercise promotes changes in bioenergetic potential and cellular redox balance, such that the magnitude of the stimulus resulting from each training protocol is capable of inducing the expression of genes involved in mitochondrial morphology and dynamics, as well as in redox balance, along the 24 hours after exercise. In this context, the present study aimed to investigate the effects of acute exercise carried out with different training protocols on the expression of genes involved in mitochondrial dynamics and oxidative defense in mice skeletal muscles. 65 male Swiss mice were divided into 4 groups: a sedentary group (5 animals) and others 3 groups (20 animals/group), which were submitted to forced swimming protocols in different forms, reported here as LIC (low intensity continuous), HIC (high intensity continuous) and HII (high intensity interval). At specific times (0h, 6h, 12h and 24h) after done the training protocol, 5 animals from each group were euthanized and the gastrocnemius muscle was removed for further analysis of the expression of genes involved in mitochondrial biogenesis (Ppargc1 α), fusion (Mfn2) and fission (Dnm1L), as well as mitophagy (Park2), inflammation (NOS2) and antioxidant defense (Nfe2l2, GPx1). Measures of lipid peroxidation (TBARS) and activity of the enzymes catalase, glutathione peroxidase (GPx) and citrate synthase (CS) were performed on all tissue samples (control, 0h, 6h, 12h and 24h) and lactacidemia measurements were performed only on samples obtained immediately after exercise. A comparison was made between groups (BIC, AIC and AII) and between measurement moments (control, 0h, 6h, 12h and 24h) within each group, and the significance level was set as $p \leq 0.05$. Lactacidemia immediately after exercise was significantly higher, the higher the exercise intensity (LIC <HIC <HII), the CS activity was significantly higher in group HII compared to the other groups over along the 24h after exercise. TBARS measurements were significantly lower in the LIC group at 0 and 6h, when compared to the other groups, in the HII group TBARS measurements progressively decreased, reaching values equal to the control at 24h after exercise, which was not observed in the HIC group, that remained significantly higher up to 24h. The catalase and GPx activity were significantly higher compared to control over 24h post exercise in all groups, however, only the group HII exhibited significantly higher GPx activity compared to group LIC immediately after exercise, and at 24h compared to the HIC group. Regarding gene expression, despite opposites in exercise intensity and duration, similar temporal behavior was observed in the expression of the Ppargc1 α gene in groups LIC and HII, with greater expression at 6 and 24h. The HIC group showed significant increases only at 0h and 6h after exercise for the Ppargc1 α gene. Mfn2 gene expression was significantly higher at 0h only in high intensity groups (HIC and HII), remaining high at 6h only in group AII. Regarding the genes involved in mitochondrial fission and mitophagy, only group HII exhibited repression of Dnm1L and Park2 gene expression during 24h after exercise, while group HIC was the unique that showed significant increase in these genes expression when compared to the other groups. Only the high intensity groups showed a significant increase in NOS2 gene expression, at 0h in the HIC group and at 6h in the HII group. As observed for the Ppargc1 α gene, the expression of the Nfe2l2 gene showed similar temporal behavior between the LIC and HII groups, with increasing increase over time, reaching significantly higher values in 24h. HII group showed significant increase only at 0h for the Nfe2l2 gene. Regarding GPx1 gene expression, the HIC group showed a significant increase at 0h, while the HII group showed a 24h increase. These results reinforce the hypothesis that changes in intensity, duration and execution mode are able to modulate differently the expression of genes and activity of enzymes involved in mitochondrial dynamics and antioxidant defense. Taken together, the results indicate that the use of intervals during high intensity exercise could provide adequate conditions to minimize the signs of oxidative damage, especially at the mitochondrial level, since fission and mitophagy-related gene expression has been suppressed

after the AII protocol, in addition to enhancing signaling for mitochondrial biogenesis and fusion, as well as enhancing antioxidant defense, which together help to maintain the mitochondrial network and make muscle cells better suited to withstand oxidative stress conditions.

Key words: Physical exercise, mitochondrial dynamics, redox balance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. CAPÍTULO 1: DESENVOLVIMENTO	4
3.1 Revisão de literatura	4
3.1.1 Estrutura e Função Mitocondrial	4
3.1.2 Dinâmica Mitocondrial	6
3.1.2.1 Biogênese Mitocondrial	6
3.1.2.2 Fusão Mitocondrial	8
3.1.2.3 Fissão Mitocondrial	10
3.1.2.4 Autofagia Mitocondrial	12
3.1.3 Balanço Redox	14
3.1.4 Exercício Físico: parâmetros fisiológicos e modalidades de treinamento	19
3.1.5 Exercício Físico na Dinâmica Mitocondrial	22
3.2 CAPÍTULO 02: ARTIGO	25
3.2.1 Introdução	25
3.2.2 Materiais e métodos	26
3.2.2.1 Animais	26
3.2.2.2 Protocolo de Exercício	26
3.2.2.3 Eutanásia dos animais e coleta do músculo gastrocnêmio	28
3.2.2.4 Dosagem de lactato plasmático	28
3.2.2.5 Avaliação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	29
3.2.2.6 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)	29
3.2.2.7 Atividade da enzima catalase (CAT)	31
3.2.2.8 Atividade da enzima citrato sintase (CS)	31
3.2.2.9 Determinação da concentração de proteínas totais	31
3.2.2.10 Análise da expressão gênica – qPCR	31
3.2.2.10.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA)	31
3.2.2.10.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	32

3.2.2.11 Análise Estatística	33
3.2.3 Resultados	33
3.2.4 Discussão	44
3.2.5 Fontes de financiamento	53
REFERÊNCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma experimental do estudo	26
Figura 2 Aparato de natação utilizado no estudo	27
Figura 3 Dosagem de lactato plasmático	33
Figura 4 Avaliação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	34
Figura 5 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)	35
Figura 6 Atividade da enzima catalase (CAT)	36
Figura 7 Atividade da enzima citrato sintase (CS)	37
Figura 8 Expressão gênica qPCR do <i>Ppargc1a</i> do músculo gastrocnêmio	38
Figura 9 Expressão gênica qPCR do <i>Mfn2</i> do músculo gastrocnêmio	39
Figura 10 Expressão gênica qPCR do <i>Dnm1L</i> do músculo gastrocnêmio	40
Figura 11 Expressão gênica qPCR do <i>Park2</i> do músculo gastrocnêmio	41
Figura 12 Expressão gênica qPCR do <i>Nos2</i> do músculo gastrocnêmio	42
Figura 13 Expressão gênica qPCR do <i>Nfe2l2</i> do músculo gastrocnêmio	43
Figura 14 Expressão gênica qPCR do <i>GPx1</i> do músculo gastrocnêmio	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Descrição de genes alvo envolvidos na dinâmica mitocondrial	32
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP adenosine diphosphate

AII – Alta intensidade intervalado

ATP – Adenosina trifosfato, do inglês *Adenosine triphosphate*

BIC – Baixa intensidade contínuo

cDNA – DNA complementar

Ct – limite de ciclo, do inglês *cycletreshold*

CTE – Cadeia transportadora de elétrons

DNA – Ácido desoxirribonucleíico, do inglês *Desoxyribonucleic acid*

Drp1 – proteína relacionada à dinamina 1, do inglês *Dynammin-1-like protein*

FIS1 – Proteína de fissão 1 mitocondrial, do inglês *Mitochondrial fission 1 protein*

FOSF-OX – Fosforilação Oxidativa

GC – Grupo Controle

GTP – Guanosina trifosfato, do inglês *Guanosine-5'-triphosphate*

HIIT – Treinamento intervalado de alta intensidade, do inglês *high intensity interval training*

MAPK – Proteína quinase mediada por AMPc do inglês, *Mitogen-activated protein kinase*

Mfn1 – Mitofusina 1

Mfn2 – Mitofusina 2

MME – Membrana Mitocondrial Externa

MMI – Membrana Mitocondrial Interna

Nrf1 Fator nuclear 2 relacionado ao eritróide fator, do inglês *Nuclear factor erythroid 2-related factor 1*

Nrf2 Fator nuclear 2 relacionado ao eritróide fator, do inglês *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

PCr – Fosfocreatina

PGC-1 α – coativador transcricional 1 α do PPAR γ , do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor*

PINK1 – proteína quinase 1 induzida por PTEN, do inglês *PTEN-induced kinase 1*

PPAR γ – receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ

qPCR - Reação em tempo real da cadeia da polimerase, do inglês *real-time polymerase chain reaction*

RE – Retículo Endoplasmático

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês *Reactive oxygen species*

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*

VO₂máx – Volume de oxigênio (O₂) máximo

1. INTRODUÇÃO

A prática regular de exercícios físicos é uma das terapias não medicamentosas mais prescritas tanto para prevenção quanto para o tratamento de doenças (1). Evidências científicas demonstram que pessoas fisicamente ativas, de todas as faixas etárias, têm níveis mais altos de aptidão cardiorrespiratória e bem-estar geral, e quando comparadas àquelas fisicamente inativas apresentam menor risco de desenvolver várias doenças crônicas (2). Dentre os principais benefícios alcançados com a execução de programas estruturados de exercícios destacam-se melhora nas respostas metabólicas, endócrinas e imunológicas, isso implica em menor risco de desenvolver várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), alguns tipos de câncer, osteoporose, disfunções musculares e transtornos psicológicos (3,4).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), recomenda que adultos saudáveis realizem pelo menos 150 minutos semanais de atividade física aeróbica de intensidade moderada ou 75 minutos quando praticada em alta intensidade (5). De tal forma, o sucesso desta intervenção depende do tipo de exercício (aeróbico vs. conta-resistido) e controle adequado de diversos parâmetros, como volume, intensidade, frequência e forma de execução (contínuo vs. intervalado) (6,7). Neste sentido, estudos apontam que o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT, *high intensity interval training*) proporciona benefícios iguais ou superiores aos obtidos com exercícios contínuos de intensidade moderada (8–11).

O HIIT é caracterizado por repetidas sessões, que podem durar desde poucos segundos até vários minutos, em intensidades perto do consumo máximo de oxigênio ($VO_{2máx}$), intercaladas por períodos de repouso ou exercício de baixa intensidade para facilitar a recuperação (12,13). É notório que ao longo da última década o interesse por esta modalidade de treinamento tem crescido, talvez por tratar-se de um treinamento que demanda menor tempo para sua execução, uma vez que dentre fatores comumente citados como limitantes à realização regular de atividade física destaca-se a falta de tempo, falta de motivação e acometimento por doenças crônicas incapacitantes (14).

Sabe-se que o exercício promove mudanças na demanda energética e maior consumo de oxigênio o que propicia aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (15). No entanto, cabe ressaltar que apesar dos potenciais danos oxidativos causados pelas ROS, elas são determinantes para expressão de genes que regulam eventos chave da dinâmica mitocondrial (i.e, biogênese, fusão, fissão e mitofagia) e também são necessárias à manutenção de um ambiente redox ideal para as atividades

bioquímicas das células. Pois as espécies reativas de oxigênio regulam vias de sinalização sensíveis ao equilíbrio redox, que promovem o crescimento, diferenciação, proliferação e apoptose celular (16,17).

Há muito tempo se discute sobre os riscos e benefícios relacionados às diferentes modalidades de treinamento, visto que exercícios de intensidades moderadas a altas podem gerar sobrecarga aos sistemas orgânicos, culminando em piores adaptações, ou mesmo prejuízos em nível molecular, celular e sistêmico (18). Não obstante, exercícios com intensidades e/ou durações muito baixas podem não alcançar estímulos suficientes para induzir as adaptações esperadas (15,19).

Considerando que o exercício físico agudo é um estímulo indutor de respostas adaptativas mitocondriais no músculo esquelético e que alterações no *status* bioenergético e balanço redox gerados durante o exercício são sinais moleculares para expressão de genes envolvidos na morfologia e dinâmica mitocondrial (20–22), se faz necessário verificar como os parâmetros de realização do programa de exercício (i.e., intensidade, duração e modalidade de execução) impactam no balanço redox e na expressão gênica de diversos tecidos ao longo de uma janela temporal de 24 horas após sua realização.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a influência dos parâmetros: intensidade, duração e forma de execução (contínuo vs. intervalado) de três protocolos de exercício físico sobre as adaptações agudas do estado redox e dinâmica mitocondrial no músculo esquelético de camundongos submetidos ao nado forçado.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar como uma única sessão de exercício físico de: baixa intensidade contínuo, alta intensidade contínuo e alta intensidade intervalado influencia a expressão de genes (*Ppargc1a*, *Mfn2*, *Dnm1L* e *Park2*) relacionados à dinâmica mitocondrial do músculo esquelético de camundongos.

- Avaliar como uma única sessão de exercício físico de: baixa intensidade contínuo, alta intensidade contínuo e alta intensidade intervalado influencia a expressão de genes (*Nfe2l2* e *Gpx1*) envolvidos da regulação do balanço redox do músculo esquelético de camundongos.

- Avaliar como uma única sessão de exercício físico de: baixa intensidade contínuo, alta intensidade contínuo e alta intensidade intervalado influencia a expressão do gene *Nos2* que codifica a isoforma indutível da enzima NOS (iNOS) responsável pela síntese de óxido nítrico.

- Avaliar a atividade enzimática da citrato sintase imediatamente e ao longo de 24 horas após a realização de uma única sessão de exercício físico executada com diferentes protocolos.

- Avaliar a atividade enzimática de enzimas antioxidantes catalase (CAT) e glutationala peroxidase (GPx) imediatamente e ao longo de 24 horas após a realização de uma única sessão de exercício físico executada com diferentes protocolos.

- Avaliar a peroxidação lipídica por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*) imediatamente e ao longo de 24 horas após a realização de uma única sessão de exercício físico executada com diferentes protocolos.

- Avaliar a concentração de lactato sérico imediatamente após a realização de uma única sessão de exercício físico executada com diferentes protocolos.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1 CAPÍTULO 01: REVISÃO DE LITERATURA

3.1.1 Estrutura e Função Mitocondrial

As mitocôndrias são consideradas como o centro da produção de energia celular, mas para além disso, elas também participam da sinalização de cálcio, homeostase redox, diferenciação, proliferação e apoptose (23,24). Nas últimas décadas, estudos baseados em tecnologias de sequenciamento genético e proteômica detalharam as bases bioquímicas e moleculares que corroboram a teoria de que as mitocôndrias surgiram há cerca de dois bilhões de anos a partir da endossimbiose de uma α -proteobactéria por uma célula eucariótica primitiva (25–29). Esta relação evolutiva é evidenciada pela estreita homologia dos complexos de cadeias respiratórias bacterianas e mitocondriais (30,31).

As mitocôndrias em uma célula podem apresentar grande diversidade morfológica, incluindo pequenas esferas, túbulos longos e túbulos interconectados (32). Morfológicamente, são organelas delimitadas por um sistema de dupla membrana de natureza lipídica, definidas como membrana mitocondrial interna (MMI) e membrana mitocondrial externa (MME) separadas por um espaço intermembranas. Apesar de seu pequeno volume, o espaço intermembrana é conhecido por abrigar cerca de 50 tipos de proteínas e também está envolvido no transporte de macromoléculas dentro e fora da mitocôndria, regulando a respiração mitocondrial e processos de apoptose (33). A MMI forma numerosas dobras e invaginações (cristas) que se estendem para o interior da matriz mitocondrial. As cristas não são dobras aleatórias na membrana, mas micro-compartimentos que se abrem através de estreitos segmentos tubulares na região periférica da membrana interna. A MME é porosa e permeável a íons e moléculas menores não carregadas que a atravessam através diversas “porinas”. A membrana externa também serve de âncora para proteínas citosólicas que intermedeiam a comunicação da mitocôndria com o retículo endoplasmático e nela estão presentes proteínas alvo envolvidas nos eventos de fissão, fusão e mitofagia (34).

Cada um dos componentes mitocondriais desempenham funções distintas, de modo que a matriz mitocondrial e a MMI representam compartimentos com maior atividade funcional (35). A membrana interna não permite a livre passagem de quaisquer íons ou moléculas e é permeada pelo complexo translocase de membrana interna e sua interação com proteínas citosólicas é essencial para regulação dos eventos de fusão e fissão (34). A conversão da energia biológica nas mitocôndrias é realizada nas cristas da membrana interna

pelos complexos proteicos de membrana da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e pela ATP sintase mitocondrial. Os complexos da cadeia respiratória contêm subunidades codificadas no núcleo e nas próprias mitocôndrias de modo que 13 subunidades são codificadas pelo genoma mitocondrial, e são parte da NADH desidrogenase (ubiquinona) ou complexo I (7 subunidades), do citocromo b-c1 ou complexo III (1 subunidade), do citocromo c oxidase ou complexo IV (3 subunidades) e da F_1F_0 -ATPase (2 subunidades) (36).

A CTE recebe os precursores reduzidos produzidos pelo ciclo do ácido tricarboxílico. Os complexos I (NADH ubiquinona oxidoredutase) e II (succinato desidrogenase) recebem os elétrons dos precursores reduzidos e o transportam para o complexo III (citocromo c redutase). O complexo IV (citocromo c oxidase) da cadeia utiliza os elétrons recebidos para reduzir O_2 à H_2O . Como resultado desse transporte, é gerado um gradiente eletroquímico no espaço intermembranar pela difusão de prótons através dos complexos da cadeia. Essa força protomotriz é responsável pela movimentação do complexo final da cadeia, a ATP sintase, maquinário enzimático que catalisa a síntese da maior parte do ATP celular (37,38). Além de seu papel na produção de energia, o gradiente eletroquímico também participa do transporte de íons cálcio para a matriz mitocondrial e é um marcador do status funcional da mitocôndria. De tal forma, as perturbações na diferença de potencial são, portanto, um sinal para ativação de vias de reparo ou destruição de mitocôndrias defeituosas (39,40).

Na matriz mitocondrial ocorre a maioria das reações biossintéticas e oxidativas, incluindo o ciclo do ácido tricarboxílico, que fornece precursores reduzidos para o transporte de elétrons e difusão de prótons pela cadeia transportadora de elétrons (41). O ciclo do ácido tricarboxílico é regulado tanto em nível de substrato, quanto por transcrição induzida por hormônios e outros fatores, com destaque para a atividade da citrato sintase, enzima responsável pela primeira reação do ciclo em que ocorre a condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato mitocondrial originando citrato. Essa reação é inibida por altas concentrações de citrato, succinil-CoA e ATP resultando na interrupção tanto do ciclo do ácido tricarboxílico, quanto da cadeia transportadora de elétrons (42).

No curso da evolução, cerca de 99% dos genes mitocondriais foram transferidos para o DNA nuclear, de modo que a grande maioria das proteínas precursoras mitocondriais são codificadas por genes nucleares e sintetizadas em ribossomos citosólicos (43). A maioria dessas proteínas migram do citoplasma para o espaço intermembranar através do complexo translocase de membrana externa de onde seguem vias divergentes que as direcionam para a membrana externa, membrana interna, ou permanecem no espaço intermembranar. A passagem do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial ocorre por meio do complexo

translocase de membrana interna (44). O genoma residual, conhecido como DNA mitocondrial (mtDNA) fica disperso na matriz e é de suma importância para manutenção da fosforilação oxidativa. Em humanos, o mtDNA tem ~16.6 quilobases de comprimento e contém 37 genes que codificam 13 polipeptídeos da CTE, 2 RNAs ribossomais (rRNAs) e 22 RNAs de transferência (tRNA) (45–47).

3.1.2 Dinâmica Mitocondrial

A dinâmica mitocondrial refere-se à observação de que as mitocôndrias passam por processos contínuos de biogênese, fusão, fissão e mitofagia. A biogênese é o processo que resulta na síntese de novos componentes mitocondriais e promove o aumento do número mitocondrial e/ou do tamanho da mitocôndria (48). A fusão mitocondrial é caracterizada pela união de duas mitocôndrias resultando em uma organela, enquanto que a fissão resulta da divisão de uma mitocôndria em duas mitocôndrias filhas (49). A autofagia mitocondrial (ou mitofagia) compreende o mecanismo pelo qual as organelas disfuncionais são eliminadas e está intimamente ligada aos processos de fissão (50,51).

Esses eventos ocorrem em graus variáveis de alongamento e fragmentação das mitocôndrias e resultam na reorganização estrutural e funcional de toda rede mitocondrial. A remodelação constante da rede também estabelece um mecanismo de controle do tamanho e número de organelas, posicionamento dentro do citoplasma, bem como controle da qualidade do mtDNA, funcionalidade bioenergética e sua interação com todo arcabouço celular (32). Embora os fenômenos relacionados à dinâmica mitocondrial ocorram em todos os tecidos de mamíferos, as fibras musculares esqueléticas apresentam um ambiente especialmente interessante, no qual a natureza dinâmica das mitocôndrias requer maior compreensão, dada a estreita inter-relação entre o metabolismo, demanda energética e a dinâmica mitocondrial (52).

3.1.2.1 Biogênese Mitocondrial

A biogênese mitocondrial requer a expressão de um grande número de genes, a maioria dos quais residem no genoma nuclear e apenas 13 subunidades proteicas da cadeia respiratória são codificadas pelo mtDNA, assim a interação núcleo-mitocôndrias é estritamente controlada por fatores e coativadores que regulam a transcrição nuclear (47,53,54). Acredita-se que coativador transcricional 1 α (PGC-1 α) do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR γ), seja o regulador mestre da biogênese mitocondrial dada sua capacidade de interagir com diversos fatores de transcrição, que por sua vez ligam-

se a regiões promotoras do DNA nuclear responsáveis pela codificação de genes mitocondriais (55–57). Sabe-se que, para além do PPAR γ , o PGC-1 α também interage com o fator respiratório nuclear 1 e 2 (Nrf1 e Nrf2), o receptor- α relacionado ao estrogênio (ERR- α), o fator 2 intensificador de miócitos (MEF2), a proteína O do *box* de forquilha O (FOXO) e proteínas de ligação a elementos reguladores de esteróis (SREBP) (58,59). Uma vez ativados, os fatores de transcrição e os receptores nucleares ligam-se ao DNA nuclear por meio do reconhecimento de regiões ricas em leucina, e consequentemente ativam o domínio transcricional N-terminal do PGC-1 α , resultando no recrutamento de histona acetiltransferase (CBP, p300 e SRC-1) e no início da transcrição gênica (60,61).

O exercício físico agudo modula a expressão de *Ppargc1a* e de outros genes também envolvidos nas vias que levam à biogênese mitocondrial e metabolismo de substratos (62,63). A contração muscular promove aumento do Ca²⁺ intracelular e consequente ativação do complexo cálcio/calmodulina (CaMKII) que por sua vez ativa o promotor de *Ppargc1a* num processo que requer locais de ligação à proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc (CREB) (64,65). No músculo, a depleção dos níveis de ATP e acúmulo de AMP, também ativa a proteína quinase dependente de AMP (AMPK) que por sua vez regula a expressão do gene *Ppargc1a* via promotor caniônico proximal. Enquanto que no tecido adiposo marron e no fígado a expressão via promotor alternativo é ativada através de um receptor β 2-adrenérgico (65–67).

O aumento do conteúdo transcricional e da atividade de PGC-1 α pode ser mantida por várias horas após a atividade muscular, o que pode estimular a biogênese mitocondrial nos estágios posteriores da recuperação (68,69). Estudos apontam que durante o repouso a expressão *Ppargc1a* através do promotor catiônicos é alta, enquanto que através do promotor alternativo é muito baixa. Outro achado é que em roedores, a expressão gênica via promotor alternativo correlaciona-se com a intensidade do exercício, por meio de mecanismos moleculares que envolvem a sinalização de cálcio, estresse metabólico e redox (66,70,71).

Nas últimas décadas, Scarpulla e colaboradores mostraram que a coativação de Nrf1 e Nrf2 por PGC-1 α , promove a expressão do fator transcrição mitocondrial A (Tfam), que estimula diretamente a replicação e transcrição do DNA mitocondrial (mtDNA), bem como de proteínas dos complexos respiratórios e envolvidas na resposta antioxidante (56,57,72). *In vitro*, estimulação aguda com oxidantes exógenos também demonstrou ativar a biogênese mitocondrial, medida pelo aumento da massa mitocondrial, mtDNA e expressão de reguladores biogênicos, como PGC-1 α , Nrf1 e Tfam, mas uma sobrecarga estimulatória também levou a disfunção mitocondrial precoce, seguida pela recuperação funcional

decorrente da regulação via PGC-1 α (73). Alguns estudos também sugerem que o PGC-1 α regula positivamente a expressão de mitofusina 2, de tal forma que a superexpressão do PGC-1 α seria capaz de prevenir a atrofia muscular através da estimulação de Mfn2, que por sua vez é reconhecidamente importante para prevenir disfunções mitocondriais, bem como atrofia muscular por desuso (74,75). Tais evidências podem indicar que a biogênese mitocondrial promova o aumento do número e/ou tamanho mitocondrial tanto pela maior síntese de novos componentes mitocondriais quanto pela formação de uma rede fusionada.

3.1.2.2 Fusão Mitocondrial

A fusão promove alongamento da rede mitocondrial e é considerada como um mecanismo de reparo para defeitos transitórios que surgem nas mitocôndrias. A fusão permite tanto a troca intermitocondrial do conteúdo da matriz, como de mtDNA, enzimas, lípidos ou metabolitos e componentes de membrana (76,77). A formação de uma rede hiperfusionada permite a redistribuição dos componentes da matriz com melhora substancial do metabolismo celular a partir da fosforilação oxidativa. Do mesmo modo, o alongamento mitocondrial também pode ser considerado como um mecanismo de “resgate” que impede a eliminação de mitocôndrias danificadas pela mitofagia, uma vez que confere proteção contra a ação do fagóforo desencadeada por mecanismos de estresse mitocondrial e de retículo endoplasmático (78). Assim, acredita-se que a fusão mantenha um pool de mitocôndrias saudáveis e funcionais na célula, podendo associar-se aos mecanismos de sobrevivência celular (49).

Sinteticamente a fusão mitocondrial é caracterizada por três etapas diferentes: a imobilização de duas mitocôndrias adjacentes em posição *trans*, o encaixe de duas membranas aumentando a área de superfície de contato e diminuindo a distância entre as duas membranas e finalmente a fusão sequencial das MME e MMI, em decorrência de mudanças conformacionais induzidas pela hidrólise do GTP (79,80). A fusão pode ser transitória quando envolve apenas as membranas externas, enquanto o processo completo requer que ambas as membranas sejam fundidas (81). Em mamíferos, a fusão da membrana é controlada por três GTPases relacionadas à dinamina, a Mitofusina1 (Mfn1) e Mitofusina2 (Mfn2) regulam a fusão da membrana externa, e a proteína atrofia óptica 1 (OPA1) controla a fusão da membrana interna (82).

Ambas as mitofusinas são proteínas transmembrana formadas por regiões conservadas que apresentam um domínio GTPase N-terminal seguido por uma região de repetição por heptação (HR1), duas regiões transmembranas que ancoram as mitofusinas à MME e uma segunda região de repetição por heptação (HR2) na extremidade C-terminal que medeia o

primeiro passo da fusão mitocondrial ao promover a imobilização e aproximação de duas mitocôndrias adjacentes. As extremidade terminais ficam voltadas para o citosol e a conexão entre as mitofusinas pode originar dímeros homotípicos (Mfn1-Mfn1 e Mfn2-Mfn2) ou heterotípicos (Mfn1-Mfn2) (80,83,84).

As mitofusinas 1 e 2 são reguladas por diferentes vias. Ambas são alvo de ubiquitilação e esta modificação pós-traducional tem consequências positivas e negativas na fusão mitocondrial. O processo de ubiquitilação requer enzimas pertencentes a três classes de proteínas chamadas E1, E2 e E3, que catalisam uma cascata de etapas sucessivas que levam à ligação covalente da ubiquitina à sua proteína alvo. A ubiquitilação de Mfn1 e Mfn2 pelas ligases de E3 do tipo Parkin ou Huwe1 induz a degradação proteossômica e inibe a fusão mitocondrial, o que resulta em fragmentação mitocondrial decorrente de eventos de fissão. Por outro lado, a ubiquitilação de Mfn1 e Mfn2 por uma E3 ligase, ainda não codificada, aumenta sua atividade fusional levando ao alongamento da rede mitocondrial (85,86). A regulação de Mfn2 é dependente da expressão de mRNA de modo que, modificações na estrutura da proteína e do sítio GTPase tem pouco interferência na sua atividade. Sob condições de demanda metabólica aumentada, o coativador transcricional 1α (PGC- 1α) e 1β (PGC- 1β) do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR γ) mostraram aumentar a expressão de Mfn2 ligando a fusão mitocondrial a mudanças na biogênese mitocondrial (87,88).

Mfn1 e Mfn2 apresentam diferentes níveis de expressão de mRNA nos diferentes tecidos, sendo observados níveis de mRNA para Mfn2 mais abundantes no tecido cardíaco e muscular (SANTEL et al., 2003). A superexpressão de mitofusinas leva à agregação mitocondrial em torno do núcleo. Enquanto camundongos *Knockout* de Mfn1 apresentam maior fragmentação mitocondrial, o mesmo modelo para Mfn2 exibe mitocôndrias esféricas e de maior volume. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que Mfn1 mostrou ter uma maior atividade de fixação de membrana que Mfn2. Não obstante, animais *Knockout* de ambas isoformas tem letalidade embrionária e a Mfn2 também é crítica para a fixação do retículo sarcoplasmático mitocondrial em cardiomiócitos, aumentando a sinalização mitocondrial de Ca^{2+} (49,90). Cipolat e colaboradores (2004), conduziram um estudo no qual observou-se que a função de OPA1 mostra uma dependência de Mfn1, mas não de Mfn2 (91).

O gene OPA1 produz oito isoformas de proteínas devido ao extenso *splicing* alternativo. Após importação, a proteína OPA1 é direcionada para MMI e permanece no espaço intermembrana. Pelo menos dois locais para clivagem proteolítica foram identificados em OPA1, assim fragmentos mais curtos e solúveis podem ser formados. Estas clivagens são

mediadas por duas metaloproteases ligadas à membrana, OMA1 e YME1L e resultam em pelo menos cinco fragmentos de OPA1, e por convenção as duas formas de alto peso molecular são referidas como L-OPA1 que prendem-se à MMI por meio do domínio transmembrana, e as três mais curtas como S-OPA1 podem interagir com a MME. A abundância das diferentes frações de OPA1 é específica do contexto celular e afeta a regulação da dinâmica mitocondrial (49).

Assim como as mitofusinas, a OPA1 é essencial para a fusão mitocondrial, além de já se ter demonstrado que é capaz de controlar a apoptose, o crescimento celular e o consumo de oxigênio. As mutações no gene da OPA1 são as principais causas de atrofia óptica autossômica dominante, a forma mais comum de neuropatia óptica hereditária. A supressão de OPA1 por RNA de interferência (RNAi) leva à fragmentação mitocondrial devido à perda de fusão mitocondrial, enquanto a superexpressão de OPA1 induz o alongamento mitocondrial (92). Na ausência de OPA1, as mitofusinas 1 e 2 mediam apenas a fusão mitocondrial superficial. Essa falta de fusão da MMI e mistura do conteúdo da matriz resulta na perda da heterogeneidade mitocondrial e na ocorrência de distúrbios metabólicos, confirmando que um papel fundamental da fusão mitocondrial é a mistura dos conteúdos da matriz (DNA mitocondrial, metabólitos e proteínas). Estudos recentes mostraram que a interação entre a L-OPA1 com a Mfn1 é suficiente para conduzir a fusão e a estimulação do metabolismo oxidativo induz a geração de S-OPA1 dependente de YME1L levando à fusão mitocondrial. Contudo, a clivagem de OPA1 pela OMA1 em resposta ao estresse mitocondrial pode levar à fragmentação mitocondrial (93,94).

3.1.2.3 Fissão Mitocondrial

A fissão desempenha um papel crítico em inúmeras vias celulares, incluindo a herança mitocondrial por células-filhas durante a divisão celular, diferenciação de células pós-mitóticas como neurônios e cardiomiócitos, e facilitam o deslocamento das mitocôndrias ao longo do citoesqueleto para regiões da célula com maior demanda metabólica. A perda da fissão resulta na perda de mtDNA, deficiência bioenergética e alterações na apoptose e originam uma rede hiperfusionada com mitocôndrias alongadas e altamente conectadas (82). Por outro lado, alguns estados patológicos, como diabetes e câncer, propiciam a formação de mitocôndrias fragmentadas produtoras de quantidade excessivas de ROS e depolarizadas (95,96).

A fissão mitocondrial é um processo que envolve várias etapas, nas quais o recrutamento da proteína relacionada à dinamina 1 (Drp1) culmina na formação de anéis

homomultiméricos ao redor das mitocôndrias e na utilização da energia liberada pela hidrólise do GTP para constrição das mitocôndrias, causando fissão (97). A Drp1 é um produto do gene *Dnm1L* e pertence à superfamília das dinaminas que foi evolutivamente conservada. Ela é uma proteína citosólica e possui 6 isoformas constituídas por 4 domínios: o domínio GTPase N-terminal que hidrolisa o GTP e fornece energia para automontagem de Drp1, o domínio médio fornece 3 das 4 hélices dos anéis homomultiméricos, o domínio variável confere especificidade para a localização de Drp1 em mitocôndrias pelo reconhecimento de proteínas localizadas na MME, e o domínio efetor de GTPase C-terminal que estimula a atividade da GTPase e contribui com 1 hélice do anel de fissão (98).

A Drp1 é ativamente recrutada para membranas mitocondriais e peroxissômicas. Nos mamíferos, a atividade da Drp1 na MME é regulada por uma variedade de modificações pós-traducionais e seu recrutamento é mediado por proteínas adaptadoras como a proteína da fissão mitocondrial 1 (Fis1), o fator de fissão mitocondrial (Mff), e o fator de alongamento mitocondrial 1 (MIEF1), também conhecido como proteínas dinâmicas mitocondriais de 49 e 51 kDa (MiD49 e MiD51). A Drp1 também pode localizar-se no sítio de contato entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria, sendo assim, há evidências que o RE participe do processo de fissão mitocondrial (99).

Após ser ativada a Drp1 é ancorada à membrana externa por meio da interação com Fis 1, Mff e proteínas dinâmicas mitocondriais (MiD49 e MiD51). Em células de mamíferos, parece que a ligação entre Fis1 e Drp1 tem um menor papel na divisão mitocondrial que a das proteínas Mff e MiD sob condições basais (100). Alguns estudos sugerem que a Fis1 atue como sinalizador do local de divisão e que o recrutamento de Drp1 só ocorre em alguns tipos de células sob condições fisiológicas específicas que estimulem a divisão mitocondrial durante o ciclo celular, hiperglicemia ou estimulação neuronal. Como consequência, a supreexpressão de Fis1 induz a fragmentação e knockdown de Fis1 e sua menor interação com Drp1 resulta em alongamento mitocondrial e retarda a progressão apoptótica subsequente (101,102).

O Mff é uma proteína da MME não encontrada em levedura. Por meio de sua porção C-terminal ele ancora-se à membrana externa enquanto a porção N-terminal interage com o Drp1. Otera et al. (2010) sugere que o Mff pode interagir com Fis1 para recrutamento de Drp1, mas que a presença do Mff é necessário para fissão, enquanto a Fis1 é dispensável, uma vez que essa interação não é perturbada em células com expressão silenciosa do gene que codifica Fis1.

A proteínas do MIEF1 (MiD49 e MiD51) ao contrário de Mff e Fis1, aparecem apenas na superfície das mitocôndrias não sendo encontradas nos peroxissomos o que as torna mais específicas para o processo de fissão mitocondrial. Ao recrutar Drp1, MiD49 e Mi51, em vez de fragmentação, elas promovem alongamento mitocondrial. Assim essas proteínas atuam competitivamente impedindo a ligação entre Fis1 e Drp1, e ao interagir com Drp1 exercem um papel inibitório no evento de fissão (104).

A fissão mitocondrial é um evento precoce durante a apoptose, ocorrendo antes da ativação das caspases e da formação de vesículas nas membranas. O processo ocorre muito próximo ao tempo de liberação do citocromo c, pois à medida que vão sendo fragmentadas as mitocôndrias prontamente começam a reter o citocromo c. Embora essa fragmentação pareça estar universalmente associada à apoptose, a fissão mitocondrial excessiva pode ocorrer na ausência de apoptose, como ocorre quando da exposição a agentes desacopladores que interrompem o potencial eletroquímico da membrana mitocondrial interna (105). Assim, enquanto a apoptose é apenas uma das várias condições que induzem a fissão mitocondrial, ela parece estar invariavelmente associada à fragmentação mitocondrial. Além disso, a fissão mitocondrial excessiva parece ser uma etapa necessária nas vias de apoptose intrínseca, pelo menos para a taxa normal de liberação de citocromo c e ativação de caspases, já que vários componentes da maquinaria de fissão mitocondrial, Drp1 e Fis1 foram implicado na progressão da morte celular programada (106,107).

3.1.2.4 Autofagia Mitocondrial

A autofagia mitocondrial, também conhecida como mitofagia é um processo que tem por finalidade eliminar mitocôndrias danificadas, exercendo um papel de destaque no controle de qualidade mitocondrial. A autofagia está intimamente ligada com os processos de fissão e fusão mitocondrial (108). A fragmentação mitocondrial dependente de Drp1 e a remodelação da crista há muito tempo tem sido associadas à apoptose em mamíferos, visto que, as mitocôndrias sofrem extensa fragmentação durante a apoptose concomitante com o aumento da permeabilidade da membrana externa mitocondrial e liberação de citocromo c. A inibição da fissão mitocondrial pela regulação negativa de Fis1, Drp1 ou Mff mostrou retardar a liberação de citocromo c, sugerindo que a fusão mitocondrial é protetora contra o insulto apoptótico (109).

Twig et al. (2008) sugerem que a fissão e a autofagia também estão associadas por mecanismos que envolvem a perda do potencial de membrana mitocondrial (76). Como a fissão mitocondrial ocasionalmente gera mitocôndrias despolarizadas e disfuncionais, espera-

se que este evento seja indutor do estado mitofágico (76). A perda do potencial de membrana pode desencadear a proteólise de OPA1 por vias dependentes do OMA1, tal fato, atenua a fusão mitocondrial e aumenta potencialmente a fissão mitocondrial mediada pelo retículo endoplasmático, resultando na fragmentação e remoção de mitocôndrias da rede fusionada. As mitocôndrias fragmentadas que apresentarem perda na capacidade respiratória podem acumular a proteína quinase 1 induzida por PTEN (PINK1), que desencadeia a mitofagia (110).

Ainda não há consenso se a fissão mitocondrial é necessária para o início da mitofagia ou se os eventos mitofágicos induzem a fissão mitocondrial para facilitar a destruição programada de mitocôndrias, no entanto é certo que os eventos de fusão, fissão e mitofagia estão intimamente relacionados. De tal forma, a ubiquitinação de Mfn2 por Parkin pode ser importante para direcionar mitocôndrias disfuncionais para mitofagia, visto que o Parkin ao eliminar a mitofusina facilita a mitofagia e estimula o processo de fissão, isso implica em um aumento no número de mitocôndrias pequenas e isoladas que podem ser mais facilmente acessadas pelo fagossoma (76). Contudo, segundo Ding & Yin (2012), a fissão mitocondrial seria necessária, mas não suficiente para a ativação da mitofagia, visto que normalmente os mecanismos de fusão de sobrepõem à mitofagia, e isso sinaliza que adicionalmente aos processos de fissão, as mitocôndrias precisam ser disfuncionais e/ou despolarizadas para induzir a mitofagia e prevenir a fusão (111).

Além de PINK1, codificada pelo gene PINK1 (ou PARK6), outras três proteínas citosólicas, como Parkina, Bnip3 (*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3*) e seu homólogo Nix3 (*Bnip3L/Nix*) estão envolvidas nos processos apoptóticos. PINK1 é uma proteína serina/treonina quinase que se fixa à membrana externa por meio do domínio transmembrana e expõem suas extremidades N-terminal e C-terminal para o citosol. PINK1 também pode ser encontrada livremente no citosol e seu recrutamento para a membrana externa pode estar envolvido nos mecanismos que distinguem mitocôndrias funcionais daquelas disfuncionais, encaminhando estas últimas para o proteossoma (112). A Parkina é uma ligase de ubiquitina E3 capaz de mediar a mono ou poliubiquitinação de proteínas utilizando diferentes ligações de ubiquitina e lisina. Ela contribui para o controle da qualidade mitocondrial ao passo que é seletivamente recrutada para mitocôndrias fragmentadas e despolarizadas, assim mitocôndrias disfuncionais são alvos seletivos desta proteína.

As organelas marcadas pela Parkina são recrutadas para o autofagossomo onde são degradadas. Duas proteínas pró-apoptóticas, Nix e Bnip3 suprimem a função de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas e amplificam o processo apoptótico ao interagir com PINK1 e

promover o acúmulo de PINK1 facilitando o recrutamento de PINK1 e Parkina. As proteínas Bnip3 e o Nix podem ligar-se à proteína ativadora de mTOR inibindo-a, resultando na ativação reduzida de mTOR e autofagia aumentada (112,113). Em mitocôndrias saudáveis, o nível de PINK1 é normalmente indetectável, uma vez que é clivado na membrana externa por PARL e exportado das organelas para ser rapidamente degradado pelo proteossoma. Em mitocôndrias despolarizadas, PINK1 ativa a mitofagia mediada por Parkin, ao recrutá-la para as mitocôndrias e ativá-la a partir fosforilação em Thr175 e Thr217, promovendo a translocação mitocondrial de Parkina. PINK1 também fosforila a ubiquitina resultando em uma maior ativação de Parkina.

Uma vez recrutada para a mitocôndria, a Parkina ubiquitina várias proteínas da MME incluindo as proteínas de fusão mitocondrial Mfn1 e Mfn2 para iniciar a mitofagia. A ubiquitinação e a degradação proteasomal de Mfn1 e Mfn2 culminam na redução da taxa de fusão e aumento da fissão e fragmentação mitocondrial. Sendo assim, a mitofagia diminui potencialmente a chance de mitocôndrias defeituosas serem fundidas com organelas saudáveis até que possam ser degradadas (82,114). O funcionamento inadequado do sistema de controle de qualidade mitocondrial, a citar a via mitofágica mediada por PINK1/Parkin, leva ao acúmulo de mitocôndrias danificadas. Então, se a proporção de mitocôndrias defeituosas superarem a rede mitocondrial saudável, todo o funcionamento das células pode ficar comprometido. Este modelo tem sido proposto como base da fisiopatologia de várias doenças neurodegenerativas, incluindo a Doença de Parkinson (115).

3.1.3 Balanço Redox

Em geral, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ROS e (RNS, do inglês, *reactive nitrogen species*) podem ser classificadas como compostos radicalares ou não radicalares. O termo atribuído aos radicais livres refere-se a espécies normalmente reativas, centradas em oxigênio, nitrogênio, carbono e enxofre que contém um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica de valência e, portanto, podem atuar como oxidantes ou redutores (116). A própria molécula de oxigênio é um radical e, devido à presença de dois elétrons desemparelhados, é referida como birradical. Os exemplos para os radicais incluem o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical de oxigênio ($O_2^{\bullet\bullet}$), o radical hidroxila (HO^{\bullet}), alcooxirradical (RO^{\bullet}), radical peroxil (ROO^{\bullet}), óxido nítrico (NO^{\bullet}) e dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}) (116). As formas não radicalares, por sua vez, não possuem elétrons desemparelhados, mas são potencialmente capazes de abstrair elétrons de outras biomoléculas, oxidando-as. As principais espécies não radicalares incluem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso

(HOCl), peroxinitrito (ONOO^-) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (117). De tal forma, a terminologia ROS compreende uma nomenclatura genérica na qual estão agrupados todos oxidantes de natureza radicalar ou não radicalar derivados do oxigênio (118,119). Enquanto que “estresse oxidativo” pode ser compreendido como o rompimento da homeostase redox com aumento relativo de espécies reativas em detrimento aos antioxidantes (116,120).

ROS e RNS são produzidas por organismos vivos como produto da respiração celular ou como resultado de enzimas específicas que parecem estar centralmente envolvidas na sinalização redox (118). O equilíbrio redox intracelular é um sistema dinâmico que pode mudar por vários fatores, dos quais destaca-se as mitocôndrias como a principal fonte de produção de ROS (119). Nas mitocôndrias os elétrons são transferidos através da cadeia respiratória para redução de O_2 em H_2O , todavia, estudos *in vitro* calculam que cerca de 1-2% dos elétrons escapam dos complexos mitocondriais I, II e III contribuindo para produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e HO^\bullet ao invés de H_2O (121,122).

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ também pode ser produzido por enzimas como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, xantina oxidase (XO), lipooxigenase, ciclooxigenase e oxidase dependente de NADPH (123,124). Ao contrário do NO^\bullet , o $\text{O}_2^{\bullet-}$ não é relativamente impermeável à membrana e, portanto, restringe-se a reagir no compartimento em que é gerado, e quando comparado com outras ROS, ele possui um tempo de meia vida longo o que permite sua difusão no meio intracelular facilitando a interação com outras moléculas da célula (125). *In vivo*, dois radicais ânions superóxido podem reagir entre si em uma reação de dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) e formar o H_2O_2 . Apesar de ser considerado um oxidante fraco, o H_2O_2 é tóxico e permeável a membranas celulares, o que o torna uma importante molécula para a sinalização celular (126,127). O H_2O_2 pode inativar enzimas bem como reagir com íons metálicos (Fe^{+2} ou Cu^+) por meio da reação de Fenton e formar o HO^\bullet que é altamente tóxico para célula podendo inclusive reagir com o DNA (128–130).

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ também pode reagir com o óxido nítrico NO^\bullet disponível na célula e formar o ONOO^- , altamente tóxico para a célula. A velocidade de formação do ONOO^- é maior do que a dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (121,131). Quando o ONOO^- é protonado, no entanto, o ácido peroxinitroso resultante (ONOOH) é um tipo incomum de hidroperóxido muito reativo que tem a capacidade de atuar tanto como hidroxila livre (HO^\bullet) quanto dióxido de azoto (NO_2^\bullet), que por sua vez podem ser reduzidos por glutathione peroxidases ou peroxirredoxinas em nitrito (NO_2^-) e água (131).

Em baixas a moderadas concentrações algumas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a citar o $O_2\bullet$, H_2O_2 e $NO\bullet$, atuam como moléculas sinalizadoras nas respostas imunológicas, no reconhecimento intercelular, na indução de resposta mitogênicas, e apoptose celular (132,133). Tais evidências são sustentadas por estudos que demonstraram que aumentos na produção de oxidantes ou mudanças drásticas na atividade das defesas antioxidantes estão intimamente associadas a alterações na expressão de genes que possuem regiões regulatórias redox-sensíveis (134–138). Considerando que as ROS são produzidas por organismos vivos como resultado do metabolismo celular normal e de fatores ambientais, como poluentes do ar ou fumaça de cigarro, o sistema antioxidante atua de forma estritamente regulada para manter baixos os níveis de radicais livres, permitindo-lhes desempenhar funções biológicas úteis sem causar danos ao organismo (118,135,139).

Por definição, antioxidante é compreendida como qualquer substância, que em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retarda, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo. Também se inclui nesse conceito moléculas que promovem adaptação fisiológica de modo a reduzir eventuais danos às biomoléculas (119). Os principais antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), heme oxigenase-1 (HO-1), tioredoxinas (Trx), peroxiredoxinas (Prx), glutathione reductase (GR) e glutaredoxinas (Grx). Os antioxidantes não enzimáticos incluem compostos de baixo peso molecular, como vitaminas (vitaminas C e E), β -caroteno, ácido úrico e a glutathione (GSH) (118,119).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima que possui 3 isoformas, e são diferenciadas pelo metal que constitui seu sítio catalítico e pela sua localização no organismo. A Cu/Zn-SOD (SOD1) é distribuída por todo o citoplasma da célula, núcleo e no espaço intermembranar da mitocôndria. As isoformas Mn-SOD (SOD2) estão localizadas na matriz das mitocôndrias, enquanto a Cu/Zn-SOD3 (SOD3) é encontrada principalmente no meio extracelular (126,140). A SOD catalisa uma reação de ordem de $\sim 2 \times 10^9 - 10^{10} M^{-1} s^{-1}$, que é $\sim 10^4$ vezes a constante de velocidade para dismutação espontânea. Nesta reação, dois $O_2\bullet$ são dismutados em H_2O_2 e oxigênio molecular. Embora seja um radical moderadamente reativo, o superóxido participa de várias reações produzindo uma variedade de ROS e RNS secundários. A SOD1 também apresenta atividade peroxidásica e consome grandes quantidades de H_2O_2 na presença de bicarbonato, produzindo o potente $CO_3\bullet$ (141,142).

As células e tecidos também possuem pelo menos três sistemas enzimáticos para remoção do H_2O_2 (143). A catalase é uma enzima presente quase em todos os tecidos vivos que utilizam o oxigênio, sendo encontrada em todos os órgãos (116,144). Em mamíferos,

CAT é conhecida por sua relativa facilidade de converter H_2O_2 em H_2O e O_2 (atividade catalítica) em altas constantes de segunda ordem ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (145,146), e sua atividade de oxidar álcoois de baixo peso molecular na presença de baixas concentrações de H_2O_2 (atividade peroxidática) (146), mas por possuir alta constante de Michaelis Menten (KM) (1,1 M) a redução de H_2O_2 ocorre especialmente em concentrações relativamente altas (147). A conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio pela catalase é um processo de duas etapas, pelo qual a catalase reduz uma molécula de peróxido de hidrogênio em água, convertendo Fe^{+3} do grupamento heme em uma espécie oxiferril Fe^{+4}O e gerando um radical de cátion porfirina. Esse intermediário de reação, referido como composto I, oxida uma segunda molécula de H_2O_2 formando oxigênio molecular e outra molécula de água (146). A atividade peroxidática da catalase resulta da capacidade do composto I de oxidar álcoois em aldeídos e água quando os níveis de peróxido de hidrogênio são insuficiente para completar o ciclo catalítico (146,147).

A GPx é uma seleno-enzima e os membros dessa família realizam a conversão do H_2O_2 em H_2O e de outros hidroperóxidos em seus respectivos álcoois, por meio de uma reação com altas constantes de velocidade ($k \sim 10^6\text{--}10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (148,149). A reação catalisada por GPx é importante na remoção de baixos níveis de H_2O_2 , visto que a atuação da CAT é mais eficaz frente concentrações mais elevadas de H_2O_2 (143,150). Atualmente se conhece ao menos oito isoformas da GPx em humanos que se diferenciam pela localização onde são encontras nos organismos, bem como pela presença do resíduo de cisteína (GPx5, 7 e 8) ou selenocisteína (GPx1, 2, 3, 4 e 6) no sítio ativo (151). A família GPx catalisam o potencial redutor da glutathiona reduzida (GSH), oxidando-a a glutathiona oxidada (GSSG), posteriormente a GSSG é recuperada pela glutathiona redutase (GR) num processo dependente de NADPH como cofator doador de elétrons, assim considera-se que a atividade de GPx seja dependente das concentrações de GSH (143,150).

O sistema tiorredoxina, é formado por uma família de proteínas, incluindo tiorredoxina (Trx), peroxiredoxina (Prx) e tiorredoxina redutase (TrxR), que desempenham um papel fundamental na defesa contra o estresse oxidativo pela remoção de oxidantes como o H_2O_2 . A Trx2 de humanos reagem com H_2O_2 a taxas comparáveis às da catalase, da glutaredoxina e heme proteínas especializada em proteínas heme e selenocisteína, e glutathiona por meio de uma reação realizada com alta eficiência ($10^7 - 10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$), e que envolve a transferência de elétrons de Trx para Prx e então TrxR mantém a concentração reduzida de Trx com NADPH como o cofator (152,153). Em mamíferos foram descritas seis isoformas de Prx, que são classificadas como isoformas típicas 2-Cys Prx (Prx1-4), isoforma atípica 2-Cys

Prx (Prx5) e uma isoforma 1-Cys Prx (Prx6) (154). Diferentemente da catalase, essas enzimas possuem KM de 0,7 μ M para H₂O₂, o que favorece a reação com H₂O₂ quando em baixas concentrações e, portanto, mais relevantes do ponto de vista de sinalização celular (154,155).

Atualmente, tem sido aceito que a interação de pelo menos quatro componentes é essencial para resposta antioxidante, a citar: (1) Nrf2 considerado como efetor mestre da resposta antioxidante e do metabolismo dos xenobióticos através da regulação de mais de 200 genes antioxidantes e de desintoxicação da Fase II (156–158), (2) Keap1 (proteína 1 associada à ECH do tipo *Kelch*), descrito como repressor citosólico do Nrf2 e desempenha um papel regulatório fundamental nesta via de sinalização, (3) um grupo de pequenas proteínas fibrosarcomas musculoaponeuróticas (sMaf), envolvidas na dimerização do Nrf2 e (4) elemento de resposta antioxidante (ARE, do inglês *antioxidante response element*) ou elemento responsivo a eletrófilos (EpRE) na região promotora dos genes-alvo regulados pelo Nrf2 (159,160).

A via Nrf2/Keap1 desempenha um papel central na citoproteção contra insultos eletrofilicos e oxidativos (161–164). A proteína Nrf2 é codificada pelo gene *Nfe2l2*, fisiologicamente o RNAm do Nrf2 (*Nfe2l2*) é expresso constitutivamente e sua expressão é controlada mediante variações no nível de proteína (165). Sob condições basais, o nível da proteína Nrf2 é mantido em um nível baixo, uma vez que no citosol, o inibidor endógeno Keap1 liga-se ao Nrf2, promove sua ubiquitinação e consequente degradação proteassomal (166,167). Em situações de estresse que levam ao acúmulo de ROS e eletrófilos, a ubiquitinação de Nrf2 é interrompida, levando à estabilização, translocação e acúmulo nuclear de Nrf2 (156,161,167). No núcleo, Nrf2 se heterodimeriza com as sMaf formando o heterodímero Nrf2-sMaf. Esses heterodímeros reconhecem o promotor ARE e ativa a expressão induzível dos genes-alvo do Nrf2 (167–169). Os mecanismos descritos para a dissociação e ativação da via do Nrf2/Keap1 são: (1) modificação do resíduo de cisteína da proteína Keap1 por ROS ou eletrófilos, (2) fosforilação do Nrf2 por quinases, incluindo MAPKs, proteína quinase C, fosfatidilinositol 3-quinase e (3) importação/exportação nuclear do Nrf2 através do complexo importina ou exportina (159,160,170).

Atualmente sabe-se que o fator de transcrição Nrf2 regula a expressão de enzimas desintoxicantes de fase II, incluindo NAD(P)H quinona oxidoreductase 1 (171), ferritina, heme oxigenase-1 (HO-1) (172) entre outros componentes-chave do sistema antioxidante, como a GPx, GR, Trx, Prx, Sulfiredoxina (Srxn) e GSH (162,173,174). Uma vez que a transcrição de genes antioxidantes protege as células contra o acúmulo de ROS, a ativação desses genes por Nrf2 pode ainda inibir indiretamente a cascata inflamatória dependente do NF- κ B. Nrf2

controla desse modo a inflamação associada ao reparo. Além disso, dados recentes apoiam um efeito inibitório do Nrf2 na expressão gênica pró-inflamatória, bloqueando diretamente a transcrição por meio de sua ligação à região promotora dos genes pró-inflamatórios como óxido nítrico sintase induzível (iNOS), IL-6, IL-1 β e TNF- α e inibe o recrutamento de RNA polimerase II (174–177).

Estudos recentes identificaram uma nova função do Nrf2 na regulação da função mitocondrial e biogênese mitocondrial. O Nrf2 está envolvido na regulação do potencial da membrana mitocondrial e na disponibilidade de substratos para respiração e síntese de ATP (178,179). Há evidências que após o estresse oxidativo, Nrf2 mediou a expressão da proteína desacopladora 3 (UCP3) e consequente aumento na transferência de prótons pela membrana mitocondrial interna para reduzir a formação de superóxido (180). Além disso, um estudo com fígado deficiente de Nrf2, a quantidade de DNA mitocondrial é significativamente menor do que nas células do tipo selvagem (181,182). Durante o estresse oxidativo, o Nrf2 também pode contribuir para a regulação da mitofagia, um processo pelo qual as mitocôndrias danificadas são removidas, através da regulação da degradação autofagossômica (183). A partir desses dados, pode-se concluir que o Nrf2 tem uma função importante na regulação mitocondrial.

3.1.4 Exercício Físico: parâmetros fisiológicos e modalidades de treinamento

A prática regular de atividades física recreativa ou esportiva vem sendo cada vez mais estimulada não só por proporcionar mudanças na imagem corporal, mas também porque confere benefícios à saúde física e mental, e consequentemente, promove uma sensível melhora da qualidade de vida, tanto de indivíduos hígidos quanto aqueles com doenças crônicas (184–186). Do ponto de vista conceitual a atividade física é definida como qualquer movimento corporal resultante da contração do músculo esquelético que aumenta o gasto energético acima do nível basal. Enquanto que o exercício físico, ou treinamento, trata-se de uma subcategoria de atividade física, definida como qualquer ação planejada e estruturada que objetiva melhorar ou manter a aptidão física (187).

Desde as primeiras publicações do ACMS datadas de 1975 e 1978 até os dias atuais, diversas recomendações têm sido propostas por agências governamentais e organizações profissionais para nortear a prática regular de exercícios e combater a inatividade física (188). As publicações mais recentes recomendam que todos os adultos saudáveis com idade entre 18 e 65 anos devem participar de atividade física aeróbica de intensidade moderada com duração mínima de ≥ 30 minutos e frequência semanal de ≥ 5 dias, ou atividade aeróbica de alta

intensidade com frequência semanal de ≥ 3 dias e duração mínima de ≥ 20 minutos. Também é recomendado que todos os adultos realizem atividades voltadas para manutenção ou aumento da força e da resistência muscular por no mínimo 2 dias semanais (189).

É importante ressaltar que é crescente a adesão a diferentes modalidades de treinamento para atingir os mais diversos objetivos desportivos e/ou relacionados à saúde, como é o caso do exercício intervalado de alta intensidade (High Intensity Interval Training – HIIT) e exercício funcional de alta intensidade (High Intensity Functional Training - HIFT) (190). Neste sentido, a Organização Mundial da Saúde e a Associação Americana do Coração alertam sobre a necessidade de controlar adequadamente os parâmetros aplicados em cada protocolo de treino considerando a variabilidade biológica e o nível inicial de aptidão de cada indivíduo (7).

A padronização e prescrição de treinamentos têm como principais parâmetros: o tipo de exercício (aeróbico ou contra-resistido); a frequência semanal; a intensidade (baixa, moderada ou alta) e a duração (curta ou longa) executados de forma contínua ou intermitente (191). Historicamente os treinamentos são categorizados em modalidades dicotômicas, o treinamento de contra-resistido, também chamado de treinamento de força, é comumente praticado por aqueles que objetivam ganho de força e aumento da massa muscular (hipertrofia), enquanto que o treinamento aeróbico ou treinamento cardiorrespiratório (ou *endurance*) é apontado como melhor opção para melhorar a aptidão cardiorrespiratória (188,191).

Trabalhos recentes questionam essa dicotomia, sugerindo que as adaptações metabólicas e fisiológicas induzidas pelo exercício são mais influenciadas pela intensidade do esforço, independente da modalidade (188). Durante o exercício em uma intensidade específica e por um período definido, o tecido muscular experimenta uma mistura específica desses estressores mecânicos e metabólicos. Com o treinamento contra-resistido, o estresse mecânico é dominante, enquanto durante o exercício de aeróbico, o estresse mecânico é baixo, mas os distúrbios metabólicos podem ser maiores e prolongados (192).

O treinamento aeróbio pode ser caracterizado como exercício de baixa carga e alta repetição, em contraste, o treinamento contra-resistido é tipicamente de alta carga e baixa repetição (193). O treinamento aeróbico tradicional envolve grandes grupos musculares em atividades de alta repetição por longo período e em intensidade baixa a moderada. Em resposta a esta modalidade de exercício ocorrem aumentos substanciais na frequência cardíaca e no gasto energético, aumento na capacidade oxidativa com estímulo à biogênese

mitocondrial e aumento da vascularização muscular, melhorando a resistência à fadiga (194–196).

A intensidade relativa para o exercício contra-resistido é baseada na capacidade do indivíduo levantar a quantidade máxima de peso em uma única repetição de um exercício empregando-se uma força contrária ao movimento, o que corresponde a 1RM (1 repetição máxima) (189). Enquanto que para exercícios aeróbios a intensidade pode ser mensurada através do consumo máximo de oxigênio (VO_2 máx), de modo que exercícios moderados são executados com VO_2 máx entre 46 a 63% e os de alta intensidade com o VO_2 máx entre 64 a 90% (189). O treinamento de contra-resistido consiste em um método de treinamento que envolve a ação voluntária do músculo esquelético contra cargas moderadas a pesadas para recrutar fibras musculares de contração rápida e maximizar as adaptações neuromusculares. (184,197).

Reconhecidamente, as principais vias bioenergéticas requisitadas durante o exercício contra-resistido são a fosfogênica e a anaeróbia láctica (198). Na via fosfogênica ou anaeróbia aláctica, a creatina fosfato (PCr) é requerida e rapidamente seu grupo fosforil de alto potencial energético é transferido para ADP no processo de ressíntese de ATP, numa reação regulada pela enzima creatina quinase. No entanto, o potencial de ressíntese desta via é limitada pela baixa quantidade de creatina fosfato armazenada no musculo. Desta forma, tem sido aceito que em esforço máximo com duração de 5 a 6 segundos, a regeneração do ATP é predominantemente por via fosfogênica (199). Na insuficiência da via fosfogênica, a via anaeróbia láctica de curto prazo é requerida. Nesta via o glicogênio muscular é utilizado como substrato em atividades de moderada a alta intensidade e duração intermediária, desta forma, a energia necessária para recompor o ATP perpassa pela glicogenólise e glicólise com produção de ácido láctico. Essa via é temporária pelo fato da regeneração do ATP não acompanhar sua utilização, diminuindo a capacidade de realizar exercícios (200).

Do ponto de vista bioenergético, o exercício aeróbico é sustentado predominantemente pela via aeróbica, na qual o metabolismo oxidativo de lipídeos e carboidratos suporta a execução do treino de longa duração em intensidade de baixa a moderadamente alta (200). Inicialmente observa-se um aumento na demanda energética celular, exigindo aumento da captação de oxigênio. Contudo, nos minutos iniciais do exercício, a oferta de oxigênio nos músculos pode ser inferior às demandas metabólicas no estado basal, havendo então um déficit de oxigênio, direcionando a ressíntese do ATP predominantemente pelos sistemas de energia imediatos e de curto prazo (i.e., PCr e glicólise). Com o passar do tempo, o consumo

de oxigênio corresponde à demanda de oxigênio e as necessidades metabólicas de estado estacionário são atendidas principalmente pelo metabolismo aeróbico de longo prazo (201).

Variações de intensidade do exercício aeróbico têm sido cada vez mais exploradas e, como reflexo, é crescente o número de adeptos ao treinamento de HIIT, no qual executa-se um exercício em alta intensidade por um curto período de tempo, seguido por um período de repouso antes de iniciar uma nova série do mesmo exercício (202). Segundo Tabata & cols (1996), o HIIT pode produzir simultaneamente adaptações na capacidade de exercício aeróbico e anaeróbico, o que justifica o crescente interesse no valor potencial do HIIT, como uma alternativa ao treinamento convencional ao longo dos últimos 20 anos (203).

Embora as organizações mundiais como o e a Colégio Americano de Medicina do Esporte e a Organização Mundial da Saúde alertem para o maior risco de lesões ortopédicas e menor aderência ao treinamento de alta intensidade quando comparado ao exercício de baixa intensidade (204), estudos recentes demonstram que treinamento de alta intensidade intervalado desencadeia adaptações musculares e vasculares agudas similares às aquelas observadas em resposta ao treinamento de endurance (12,205,206).

O interesse pelo exercício de alta intensidade como um modo eficaz de treino se intensificou ao longo da última década em reconhecimento de três fatores principais que são comumente citados como limitações à atividade física regular: falta de tempo, falta de motivação e doenças crônicas que restringem a execução do treinamento (207). Por ser de baixo volume (i.e., o produto da carga de treinamento pelo tempo de exposição a esta), as sessões de exercício tendem a durar menos de 30 minutos, representando assim uma alternativa ao treinamento de endurance, o que torna mais viável a prática regular do treino pela sociedade contemporânea, sem prejuízo quanto aos potenciais benefícios para redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis (208).

3.1.5 Exercício Físico no Balanço Redox e Dinâmica Mitocondrial

A geração primária de ROS e RNS durante o exercício físico agudo pode ocorrer por várias vias, como NADPH oxidase, XO, lipoxigenases, cicloxigenases e respiração mitocondrial (116,123). Sabidamente, exercício físico é uma condição que promove aumentos na demanda energética na ordem de até 35 vezes em relação ao repouso (209) e aumento de até 100 vezes no fluxo de oxigênio através dos músculos esqueléticos ativos (210). Acredita-se que cerca de 2% a 5% do oxigênio consumido origina ROS (211), como o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , especialmente pela atividade mitocondrial intensa (212–214).

Embora esteja consolidado que o treinamento físico periódico promova adaptações fenotípicas no músculo esquelético e que essas adaptações perpassam pela resposta mitocondrial (215), é essencial compreender melhor o comportamento dos eventos envolvidos na dinâmica mitocondrial e balanço redox frente a estímulos agudos originados de exercícios realizados com diferentes parâmetros, uma que a exposição repetida a um evento agudo desencadeia o estresse mecânico, metabólico, oxidativo, termorregulatório e hipóxico. É essa exposição que estimula adaptações fisiológicas compensatórias que melhoram a tolerância a subsequentes estressores de mesma magnitude (215).

O músculo esquelético é caracterizado por seu alto conteúdo mitocondrial e sua capacidade de se adaptar a esses estressores (192). Dependendo do tipo e frequência do exercício, diferentes alvos são preferencialmente regulados (192,216). O exercício agudo promove crescimento abrupto e transitório do conteúdo de mRNA, mas que retorna à condição basal cerca de 24 horas após interrupção do trabalho mecânico. Enquanto que o exercício crônico induz adaptações fisiológicas que podem modificar o fenótipo muscular (215,217,218).

A somatória dos efeitos agudos de cada sessão de exercício o resulta no aumento gradual e progressivo do conteúdo de mRNA e de proteínas o que contribui para maximizar a entrega de substrato necessária para a síntese de ATP, melhorar a oferta de oxigênio com consequente capacidade respiratória e modular a dinâmica mitocondrial. Coletivamente as respostas adaptativas agudas aumentam a resistência a fadiga, otimizam a performance em futuros esforços físicos com menor perturbação da homeostase orgânica (215,219,220).

Evidências demonstram que a expressão de mRNA são elevadas 3 a 12 horas após a realização do exercício físico, retornando aos níveis basais em torno de, aproximadamente, 4 horas. Desta forma, observa-se que as adaptações crônicas induzidas pelo exercício provêm do acúmulo dos efeitos agudos em cada sessão decorrente do estresse mecânico e metabólico gerado durante a realização do exercício. É importante ressaltar que os parâmetros do exercício praticado (i.e., intensidade, duração, frequência e modalidade) influenciam diretamente no tipo de magnitude das respostas moleculares subsequentes o exercício (215,221).

A distribuição e o volume das mitocôndrias dentro das fibras musculares refletem um equilíbrio entre a distância necessária para a difusão de metabólitos e oxigênio transportados dos capilares até as mitocôndrias. Devido à plasticidade mitocondrial sabe-se que modificações nos parâmetros do exercício realizada em uma única sessão é capaz de provocar

grandes mudanças na transcrição de genes que modulam a morfologia e função mitocondrial (22,222).

3.2 CAPÍTULO 02: ARTIGO A SER SUBMETIDO NA MEDICINE AND SCIENCE IN SPORTS AND EXERCISE

Análise temporal da dinâmica mitocondrial e balanço redox induzida por diferentes protocolos de exercício físico

3.2.1 Introdução

A prática regular de atividades física vem sendo cada vez mais estimulada não só por proporcionar mudanças na imagem corporal, mas também porque confere benefícios à saúde física e mental, e conseqüentemente, promove uma sensível melhora da qualidade de vida, tanto de indivíduos hígidos quanto aqueles com doenças crônicas (184–186). A realização de exercício físico de forma planejada e estruturada objetivando melhorar ou manter a aptidão física envolve o controle de alguns parâmetros, como volume de treinamento, intensidade, frequência, duração e do tipo de exercício a ser praticado, o que influencia diretamente o tipo e a magnitude das adaptações induzidas pelo exercício (221,223).

O tipo de adaptação biológica induzida pelo exercício está na dependência dos parâmetros de execução do mesmo, sendo amplamente reportado que exercícios de baixa intensidade e longa duração tendem a gerar adaptações direcionadas à melhora do metabolismo oxidativo pelo tecido muscular, enquanto exercícios de alta intensidade e menor duração levam a adaptações direcionadas à melhora do metabolismo anaeróbio (215,221). Curiosamente, estudos recentes com exercícios de alta intensidade e intervalado mostraram um grande potencial para adaptações mitocondriais (221,223), mostrando que, para além da intensidade do exercício, sua forma de execução pode ser um parâmetro de grande influência nas adaptações mitocondriais induzidas pelo exercício físico.

O exercício físico é capaz de induzir eventos mitocondriais como mitogênese, fusão mitocondrial, fissão mitocondrial e até mesmo mitofagia (22,212,222), os quais ocorrem com o objetivo de manter o *pool* mitocondrial saudável, de modo a manter um adequado aporte de ATP, sem impor à célula uma condição de desbalanço redox (212,224). Estas adaptações mitocondriais tem sido foco de estudos recentes envolvendo exercício físico, mas as comparações entre protocolos de exercício têm se limitado a exercícios de alta intensidade intervalado e de intensidade moderada realizado de forma contínua, não sendo identificado na literatura científica estudos comparando a realização de exercício com mais variações de intensidade e forma de execução.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos do exercício agudo executado em diferentes protocolos de treino sobre a expressão de genes envolvidos na dinâmica mitocondrial e defesa antioxidante em músculos esqueléticos de camundongos.

3.2.2 Materiais e Métodos

3.2.2.1 Animais

Foram utilizados 65 camundongos *Swiss*, machos, com 3 meses de idade (12 semanas), provenientes da ANILAB (Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda – EPP). Os animais foram mantidos no biotério da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus de Jequié, em ambiente com controle de ciclo claro-escuro (12 horas de luz, das 7 às 19h) e temperatura ($23\pm 3^{\circ}\text{C}$). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Campus Itapetinga (protocolo número: 175/2018).

Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno com quatro camundongos em cada uma delas e durante todo o experimento tiveram acesso *ad libitum* à água e ração controle comercial (Pragsoluções, Brasil).

3.2.2.2 Protocolo de Exercício

Todos os animais foram expostos a 5 dias de adaptação ao ambiente aquático (5 minutos dentro do aparato de nado com água no nível das patas). Dois dias após o término do período de adaptação, os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos: um grupo sedentário (5 animais) e 3 grupos com 20 animais cada, que foram submetidos a protocolos de nado forçado com diferentes formas de execução descritos a seguir e esquematizado na Figura 1:

- 1) Grupo controle (GC): camundongos que foram sacrificados sem serem submetidos previamente a exercício físico;
- 2) Grupo exercício de baixa intensidade realizado de modo contínuo (BIC): 30 minutos de nado forçado com 1% da massa corporal (MC);
- 3) Grupo exercício de alta intensidade realizado de modo contínuo (AIC): 15 minutos de nado forçado com 5% da MC;
- 4) Grupo alta intensidade realizado de modo intervalado (AII): 7 minutos de nado forçado com 10% da MC, sendo realizado com ciclos exercício/repouso de 20/10 segundos;

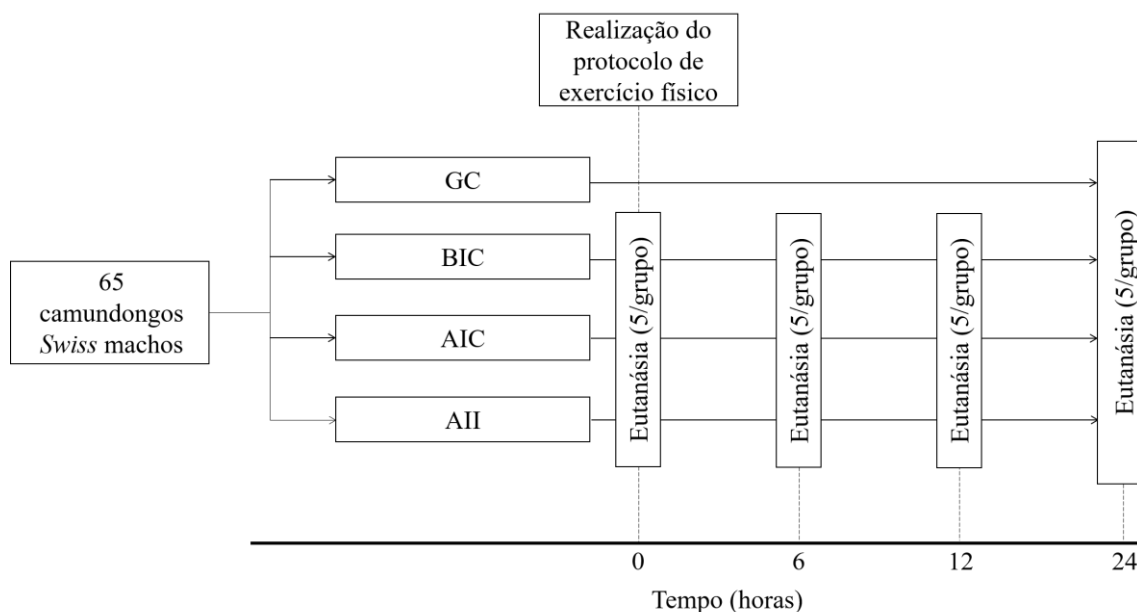


Figura 1. Fluxograma experimental do estudo.

Para realização do exercício, pacotes com pequenas esferas de chumbo foram presos à base da cauda dos animais e o peso dos pacotes foi calculado de acordo com a massa corporal (MC) de cada animal, estabelecendo-se 1% da MC para o grupo BIC, 5% para o grupo AIC e 10% para o grupo AII. A massa corporal dos animais foi mensurada por meio de uma balança digital (VL-3200H, Shimadzu, EUA). Posteriormente os animais foram colocados em um aparato de natação descrito por Evangelista e colaboradores (2003) com adaptações, composto de um aquário de vidro (35 cm de altura, 35 cm de largura e 50 cm de comprimento) e um sistema de quatro baias de acrílico (35 cm de altura, 15 cm de largura e 15 cm de comprimento para cada baia), e a temperatura constante (32°- 34° C) (Figura 2) (225). A execução dos protocolos de exercício foi supervisionada afim de garantir a padronização do nado, de tal forma, os animais se exercitaram de maneira uniforme e contínua na superfície, com um tempo mínimo submerso ou boiando.



Figura 2. Aparato de natação utilizado no estudo.

3.2.2.3 Eutanásia dos animais e coleta do músculo gastrocnêmio

Cinco animais de cada grupo experimental foram eutanasiados nos seguintes momentos após a realização do protocolo de exercício:

- imediatamente após (0h);
- 6 horas após (6h);
- 12 horas após (12h);
- 24 horas após (24h).

A eutanásia dos animais foi conduzida através de aprofundamento anestésico com administração intraperitoneal de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (16 mg/kg), seguida da coleta de sangue por decaptação. Após a eutanásia os músculos gastrocnêmios foram cuidadosamente dissecados, pesados, identificados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultra freezer à -70°C para posterior avaliação.

3.2.2.4 Dosagem de lactato plasmático

O lactato plasmático foi mensurado pelo método automatizado de ensaios por kit enzimático colorimétrico monorreagente composto por: lactato oxidase 400 U/L e peroxidase (rábano) 2.400 U/L (ABBOTT, EUA). O método fundamenta-se na conversão do ácido láctico a piruvato e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima lactato oxidase, enquanto que a peroxidase catalisa a oxidação do precursor cromógeno pelo H_2O_2 para produzir um corante colorido. Um aumento na absorbância a 548 nm é diretamente proporcional à concentração de ácido láctico na amostra (ABBOTT, EUA). Todo procedimento foi realizado no equipamento ARCHITECT c800 (ABBOTT, EUA).

3.2.2.5 Avaliação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica no homogenato do musculo gastrocnêmio foi estimada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o método proposto por Draper e colaboradores (226). O tecido muscular (100 mg/mL) foi homogeneizado em tampão Tris HCl (50 mM), pH 8,0, contendo hidroxitolueno butilado (0,02%) para evitar oxidações espúrias. Em seguida, o homogenato foi centrifugado (Z36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) a 1600g por 10 min a 4 °C para coleta do sobrenadante. Posteriormente, o sobrenadante foi diluído a 50% no tampão Tris HCl, num volume final de 100 µL, acrescido de 100 µL de ácido tricloroacético 10%, e 800 µL de ácido tiobarbitúrico (530 mg dissolvidos em 100 mL de ácido acético 20%). A mistura reacional foi incubada por 1 h a 95° C, seguido do resfriamento em gelo por 10 min a fim de cessar a reação. As amostras foram novamente centrifugadas (1600g, 10 min a 4° C) e a absorbância medida a 535 nm (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil). A concentração de TBARS no tecido pulmonar foi calculada com base na curva feita com o padrão de malondialdeído (0-50 µM) (CAYMAN, EUA), normalizada pela concentração de proteínas e expressa em mol de equivalentes de MDA/g de proteína.

3.2.2.6 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A medida da atividade da enzima GPx foi feita de acordo método proposto por Paglia e Valentine (1967). O método se baseia na oxidação da glutathiona reduzida (GSH), catalisada pela GPx, acoplada à reciclagem da glutathiona oxidada (GSSG) através da reação catalisada pela enzima glutathiona redutase (GR) que utiliza o NADPH como cofator (227). O decréscimo na absorbância medida à 340 nm durante a oxidação do NADPH é indicativo da atividade da GPx. O tecido muscular foi homogeneizado em tampão Tris HCL 50 mM, pH 7,0 (tampão de ensaio) na proporção de 100 mg/mL. Após centrifugação a 10000g por 15 minutos à 4° C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha), o sobrenadante foi removido e utilizado no ensaio. Foram pipetados em cubeta de quartzo 300 µL de tampão de ensaio, 250 µL de homogenato diluído em tampão de ensaio (1:10) e 400 µL do mix reacional (0,25 mM NADPH, 2,1 mM de GSH, 0,5 U/mL de GR e 1 mM de azida sódica). A azida sódica foi adicionada ao meio para inibir a catalase que também utiliza o peróxido de hidrogênio como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de H₂O₂ 0,2 mM, utilizado como substrato da reação. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil) a 340 nm. Foram realizadas leituras consecutivas a cada

15 segundos durante 6 minutos. A atividade da GPx foi calculada utilizando a fórmula descrita:

$$\text{Atividade da Gpx} = \frac{(\Delta A_{340}/\text{min}) \times (\text{VR})}{(6,22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times (\text{VA})}$$

Onde:

ΔA_{340} é o delta da absorvância por minuto;

6,22 é o coeficiente de extinção molar do NADPH em unidades de $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$;

VR é o volume de reação em mL;

VA é o volume de amostra em mL;

Uma unidade de enzima é definida como a quantidade de enzima que causa a oxidação de 1 μmol de NADPH por minuto. A atividade específica foi expressa em unidades por miligrama de proteína.

3.2.2.7 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pela taxa de decaimento de H_2O_2 na absorvância de 240 nm (228). O músculo gastrocnêmio (100 mg/mL) foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,2), em seguida foi centrifugado por 10 minutos a 10.000g a 4 °C (Z36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha). Foi incubado um volume de 100 μL do sobrenadante com 900 μL do mix reacional (25 mL de tampão fosfato para 40 μL de peróxido de hidrogênio 30%), sendo as absorvâncias determinadas imediatamente a cada 10 s, durante um min a 240 nm em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil). Para zerar o aparelho, utilizou-se tampão fosfato como branco. A atividade da CAT foi determinada pelo decaimento da absorvância em 240 nm causada pelo desaparecimento do H_2O_2 , sendo calculada pela fórmula descrita:

$$\text{Atividade da CAT} = \frac{(\Delta A_{240}/\text{min}) \times (\text{VR})}{(39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times (\text{VA})}$$

Onde:

ΔA_{240} é o delta da absorvância por minuto;

39,4 é o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 em unidades de $39,4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

VR é o volume de reação em mL;

VA é o volume de amostra em mL.

Uma unidade da enzima corresponde a decomposição de 1 μmol de H_2O_2 por minuto. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína.

3.2.2.8 Atividade da enzima citrato sintase (CS)

O método proposto por Spinazzi et al (2012) descreve a medida da atividade enzimática da CS que é utilizada como marcador exclusivo da abundância de mitocôndrias presentes no tecido ou cultura celular de interesse (229). A CS é a enzima inicial do ciclo do ácido tricarboxílico, e catalisa a reação entre a acetil coenzima A (acetil CoA) e oxalacetato para formar o ácido cítrico e CoA ligada a um grupo tiol (CoA-SH). O ensaio colorimétrico se baseia na reação entre o ácido 5',5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB) e CoA-SH para formar o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), de modo que o aumento progressivo da absorbância é proporcional à atividade da CS. Para realização do ensaio, o tecido muscular foi homogeneizado na proporção de 100mg/mL em tampão Tris HCL 250 mM, pH 7,4 suplementado com sacarose (85,4 mg/mL), em seguida centrifugado a 600xg por 10 minutos à 4° C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) e o sobrenadante separado para o ensaio. Para cada poço da placa de 96 poços foram adicionados 126 μL do mix reacional (100 μL de tampão Tris HCL 200 mM + Triton 100x 0,2%, 20 μL de DTNB 1 mM e 6 μL de Acetil CoA) e 64 μL da amostra. A reação foi iniciada ao adicionar 10 μL de oxalacetato 10 mM a cada poço, e o aumento da absorbância foi monitorada em espectrofotômetro de placa (Thermoplate, Tp-reader, EUA) a 412 nm em intervalos de 10 segundos, durante 3 minutos. A atividade da CS foi calculada utilizando a fórmula descrita:

$$\text{Atividade da CS} = \frac{(\Delta A_{412}/\text{min} \times 1,000)}{[(13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} \times \text{VA}) \times (\text{proteína total mg/ml})]}$$

3.2.2.9 Determinação da concentração de proteínas totais

As concentrações de proteínas nos homogenatos de tecido renal utilizados para os ensaios de peroxidação lipídica e atividade enzimática (GPx, CAT e CS) foram determinadas em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil) utilizando o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, EUA) e a albumina do soro bovino foi utilizada como padrão para construção da curva de concentração (230).

3.2.2.10 Análise da expressão gênica – qPCR

3.2.2.10.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA)

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente de lise TRIzol™ (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, e o sistema TissueRuptor (Qiagen, EUA) foi usado para homogeneização do músculo gastrocnêmio. Durante o processo de purificação, o RNA foi tratado com TURBO DNA-free™ (Invitrogen, EUA) para digestão de possíveis contaminações por ácido desoxirribonucléico (DNA), seguindo as orientações do fabricante. A concentração (ng/μL) e pureza (A₂₆₀:A₂₃₀ e A₂₆₀:A₂₈₀) do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific, EUA). O RNA isolado foi mantido em ultra freezer à -70°C até o momento da transcrição reversa.

3.2.2.10.2 Síntese do DNA complementar (cDNA) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

O cDNA foi sintetizado com 2 μg do RNA total por meio do kit de transcrição reversa High-Capacity RNA-to-cDNA™ (AppliedBiosystem, EUA), segundo as instruções do fabricante. Este material foi estocado em ultra freezer à -70°C até o momento da realização da qPCR. Para examinar os níveis de expressão de 5 genes alvos envolvidos na dinâmica mitocondrial (Tabela 1) foi usado o sistema TaqMan® Fast Advanced Master Mix (AppliedBiosystem, EUA):

Gene	Identificação do Ensaio	Código de Referência
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1	4453320
<i>Ppargc1a</i>	Mm01208835_m1	4453320
<i>Mfn2</i>	Mm00500120_m1	4453320
<i>Dnm1L</i>	Mm01342903_m1	4448892
<i>Park2</i>	Mm01323528_m1	4448892
<i>Nfe2l2</i>	Mm00477784_m1	4453320
<i>Gpx1</i>	Mm00656767_g1	4453320
<i>Nos2</i>	Mm00440502_m1	4453320

Tabela 1. Descrição de genes alvo envolvidos na dinâmica mitocondrial, sistema TaqMan® Fast Advanced Master Mix

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as instruções do fabricante e a termociclagem foi realizada com o termociclador StepOne Plus (AppliedBiosystem, EUA). A expressão gênica foi normalizada pelo gene *housekeeping* codificador da proteína constitutiva GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

A partir da obtenção dos resultados de Ct (*cycle-threshold*) fornecidos pelo termociclador, calculou-se a expressão relativa (*fold-change*) por meio do método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (231).

3.2.2.11 Análise estatística

Para fins de análise estatística as comparações foram feitas com os intervalos de tempos após exercício (0h, 6h, 12h e 24h) no mesmo grupo e entre os 3 grupos (BIC vs AIC vs AII). Todas as variáveis de interesse deste estudo foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. As comparações entre os grupos foram realizadas com ANOVA One-way, seguido pelo teste post hoc de Tukey, sendo adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$ para todos os testes. Os dados foram apresentados em média \pm erro padrão e todos os procedimentos estatísticos foram realizados no software Graphpad Prisma 7.0.

3.2.3 Resultados

Lactato, atividade Enzimática (citrato sintase, catalase e GPx) e TBARS

A medida da lactacidemia imediatamente após o exercício (0h) indicou valores significativamente maiores no grupo AII, quando comparado aos demais grupos, enquanto o grupo AIC também apresentou valores significativamente maiores que o grupo BIC (Figura 3).

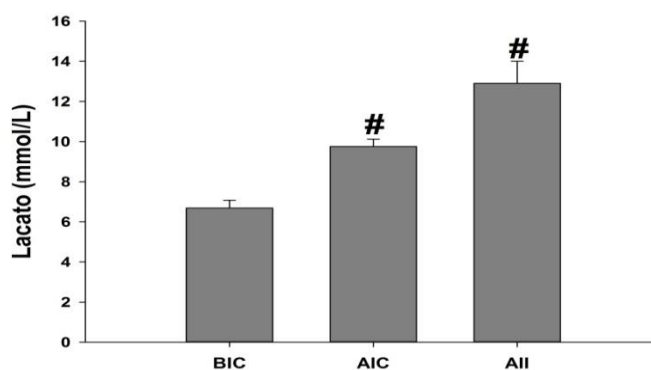


Figura 3. Lactato plasmático dos animais treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados imediatamente (0h) após realização de 1 única sessão de treinamento. (#) Diferente dos demais grupos ($p < 0,05$).

A atividade da enzima citrato sintase foi significativamente maior em relação ao controle, imediatamente (i.e., 0h) e 6h após o exercício em todos os grupos estudados. No grupo BIC a atividade da CS retornou aos valores obtidos no grupo controle já em 12h após o exercício. No entanto, no grupo AIC a atividade da enzima se manteve significativamente maior até a medida de 12h após o exercício, sendo significativamente maior em 0h, 6h e 12h, em relação a 24h após o exercício. As medidas da atividade da CS em 12h após o exercício no grupo AIC foi significativamente maior em relação ao grupo BIC no mesmo momento. No grupo AII a atividade da CS se manteve maior em relação ao controle até a medida de 24h após o exercício, além disso, a medida imediatamente após o exercício foi significativamente maior em 0h, quando comparado ao grupo BIC e maior em relação aos demais grupos nas medidas de 6h, 12h e 24h após o exercício (Figura 4).

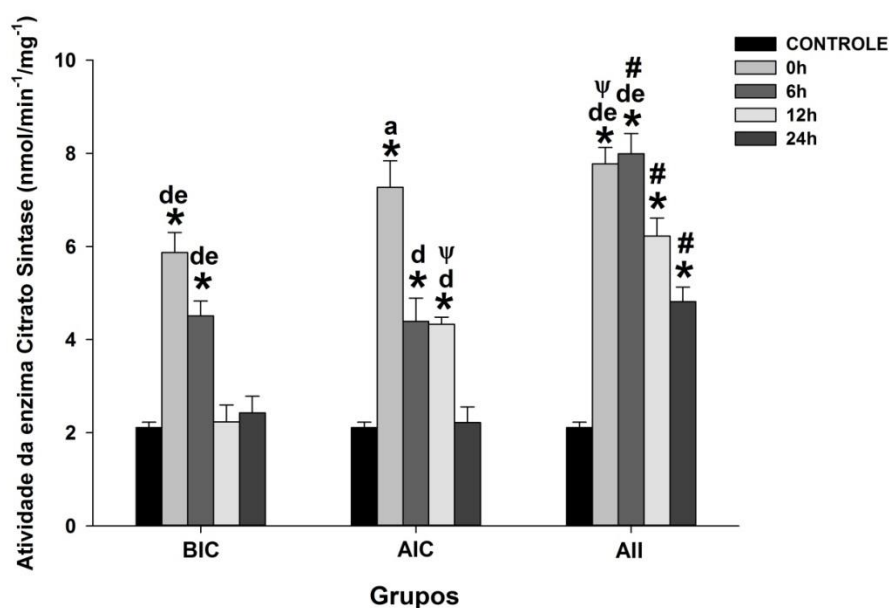


Figura 4. Atividade da enzima Citrato Sintase do músculo gastrocnêmio dos animais treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. (*) Diferente do controle; (a) Diferente dos demais momentos no mesmo grupo; (d) Diferente de 24h no mesmo grupo; (e) Diferente de 12h no mesmo grupo; (Ψ) Diferente de BIC no mesmo momento; (#) Diferente dos demais grupos no mesmo momento.

A medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi significativamente maior em relação ao controle, imediatamente (i.e., 0h) e 6h após o exercício em todos os grupos estudados. No grupo BIC esta retornou aos valores obtidos no grupo controle já em 12h após o exercício. No entanto, no grupo AIC esta se manteve significativamente maior até a medida de 24h após o exercício, sendo significativamente nas

medidas em 0h, 6h, quando comparado às medidas em 12h e 24h após o exercício. No grupo AII a medida de TBARS se manteve significativamente maior que o controle até 12h após o exercício, retornando aos valores do controle na medida de 24h após o exercício. A medida de TBARS no grupo AII foi reduzindo significativamente ao longo do período de tempo estudados. Na comparação entre grupo, as medidas de 0h e 6h do grupo BIC foram significativamente menores em relação aos demais grupos, enquanto a medida de 6h do grupo AIC foi significativamente maior em relação aos demais grupos. Nas medidas de 12 e 24h o grupo AIC manteve maior TBARS quando comparado aos demais grupos ($p < 0.05$) (Figura 5).

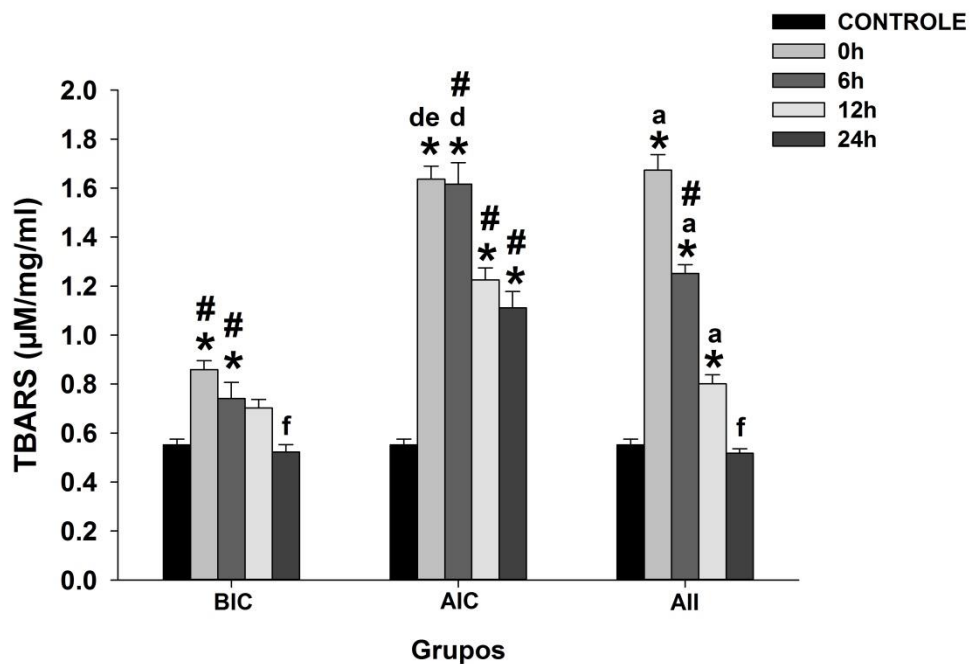


Figura 5. Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do músculo gastrocnêmio dos animais treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. (*) Diferente do controle; (a) Diferente dos demais momentos no mesmo grupo; (d) Diferente de 24h no mesmo grupo; (e) Diferente de 12h no mesmo grupo; (f) Diferente de 0h, 6h, 12h e 24h no mesmo grupo (#) Diferente dos demais grupos no mesmo momento.

A atividade da enzima catalase foi significativamente maior em relação ao controle, em todos os momentos após o exercício em todos os grupos estudados. Apenas o grupo BIC apresentou diferença significativa ao longo do tempo após o exercício, sendo observado atividade significativamente maior em 12h e 24h após exercício quando comparado às

medidas de 0h e 6h ($p < 0.05$). Não foi observada diferença significativa entre os grupos em qualquer momento analisado ($p > 0.05$) (Figura 6).

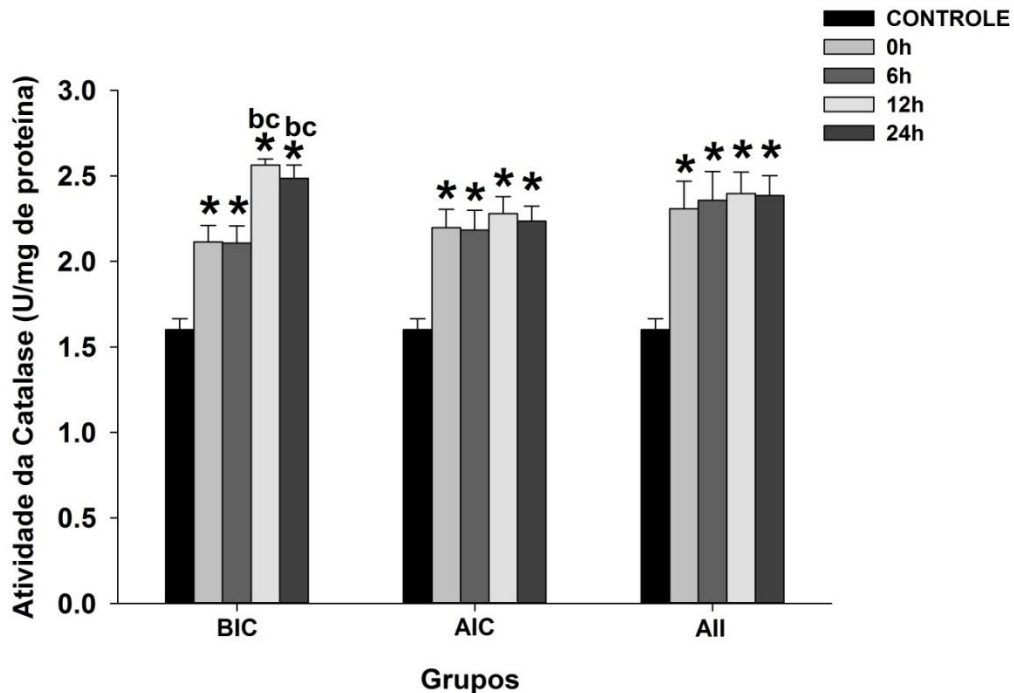


Figura 6. Atividade da enzima Catalase do músculo gastrocnêmio dos animais treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. (*) Diferente do controle; (b) Diferente de 0h no mesmo grupo; (c) Diferente de 6h dentro do mesmo grupo.

A atividade da enzima GPx foi significativamente maior em relação ao controle, em todos os momentos após o exercício em todos os grupos estudados. Os grupos BIC e AII apresentaram diferença significativa ao longo do tempo após o exercício, sendo que, no grupo BIC, foi observada atividade significativamente maior em 6h, 12h e 24h após exercício quando comparado à medida de 0h ($p < 0.05$), enquanto no grupo AII a medida de 24h foi significativamente maior em relação às medidas de 0h e 6h após o exercício. A comparação entre grupo mostrou que o grupo AII apresentava atividade significativamente maior em relação ao grupo BIC imediatamente após o exercício (i.e., 0h) e em relação ao grupo AIC na medida de 24h após o exercício ($p < 0.05$) (Figura 7).

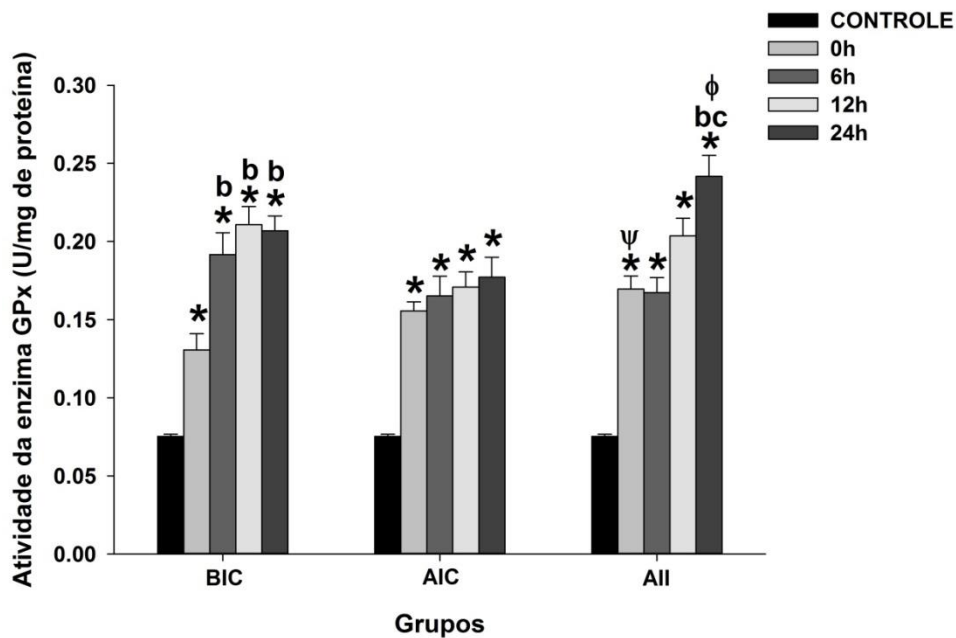


Figura 7. Atividade da enzima GPx do músculo gastrocnêmio dos animais treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. (*) Diferente do controle; (b) Diferente de 0h no mesmo grupo; (c) Diferente de 6h dentro do mesmo grupo; (ψ) Diferente de BIC no mesmo momento; (φ) Diferente de AIC no mesmo momento.

Expressão gênica

A expressão gênica de *Pparg1α*, que codifica o fator de transcrição *PGC1-α*, foi significativamente maior em relação ao grupo controle em 6, 12 e 24h, no grupo BIC, enquanto no grupo AIC esta diferença ocorreu nos momentos 0h e 6h e no grupo AII nos momentos 6h e 24h. Adicionalmente, nos grupos BIC e AII a expressão do referido gene foi maior no momento 6h quando comparado aos demais momentos de medida, enquanto no grupo AII a expressão em 24h foi significativamente maior em relação a 0h dentro do mesmo grupo. A única diferença entre grupos foi observada na medida 0h, onde o grupo AIC apresentou expressão significativamente maior ($p < 0.05$) (Figura 8).

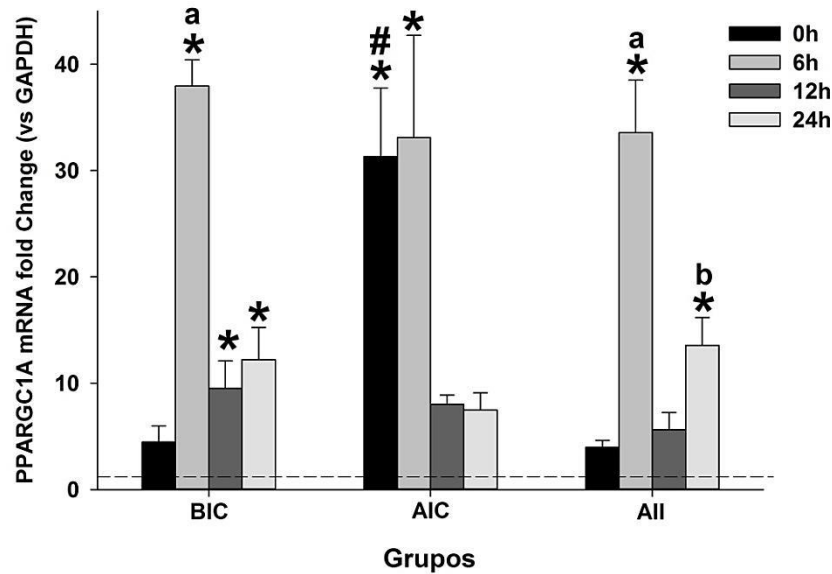


Figura 8. Expressão gênica do *Ppargc1a* no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos não treinado (CONTROLE), treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. A linha tracejada indica a expressão do grupo de referência (i.e., grupo não exercitado, denominado aqui de grupo controle). (*) Diferente do controle; (a) Diferente dos demais momentos no mesmo grupo; (b) Diferente de 0h no mesmo grupo; (#) Diferente dos demais grupos no mesmo momento ($p < 0.05$).

A expressão gênica de *Mfn2*, que codifica a proteína mitofusina 2, foi significativamente maior em relação ao grupo controle imediatamente (i.e., 0h) nos grupos AIC e AII. Adicionalmente, no grupo AIC a expressão do referido gene foi significativamente maior no momento 0h quando comparado aos demais momentos de medida, enquanto no grupo BIC a expressão em 24h foi significativamente maior em relação a 0h e 6h dentro do mesmo grupo. As únicas diferenças entre grupos foram observadas na medida 0h, onde o grupo AIC apresentou expressão significativamente maior que o grupo BIC, e em 6h, onde o grupo AII apresentou expressão significativamente maior que o grupo BIC ($p < 0.05$) (Figura 9).

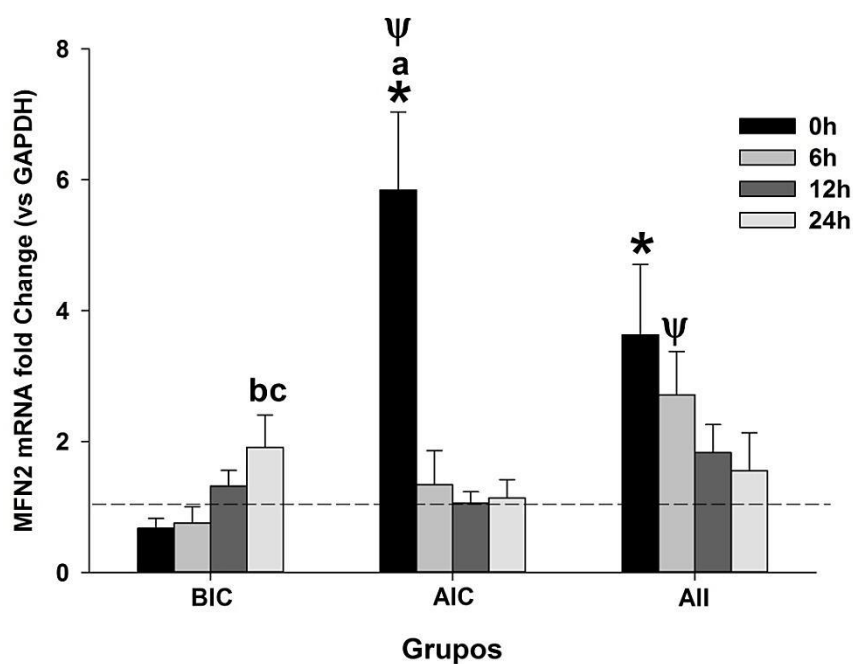


Figura 9. Expressão gênica de *Mfn2* no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos não treinado (CONTROLE), treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. A linha tracejada indica a expressão do grupo de referência (i.e., grupo não exercitado, denominado aqui de grupo controle). (*) Diferente do controle; (a) Diferente dos demais momentos no mesmo grupo; (b) Diferente de 0h dentro do mesmo grupo; (c) Diferente de 6h dentro do mesmo grupo; (Ψ) Diferente de BIC no mesmo momento.

A expressão gênica de *Dnm1l*, que codifica a proteína Drp1, foi significativamente maior em relação ao grupo controle 6h e 12h no grupo AIC, havendo uma redução significativa no mesmo grupo em 24h após o exercício. Diferentemente, o grupo AII apresentou redução significativa imediatamente (i.e., 0h) e 24h após o exercício. Adicionalmente, no grupo BIC a expressão do referido gene foi maior no momento 6h quando comparado aos momentos 12 e 24h, enquanto no grupo AIC a expressão em 6h e em 12h foi significativamente maior em relação a 0h e 24h dentro do mesmo grupo. No grupo AII, a expressão foi significativamente menor em 0h, quando comparado a 6h e 24h no mesmo grupo. Nas comparações entre grupos observou-se expressão significativamente maior no AIC 12h após o exercício, quando comparado aos demais grupos, enquanto o grupo AII apresentou expressão significativamente menor imediatamente após o exercício, quando comparado ao grupo BIC. ($p < 0.05$) (Figura 10).

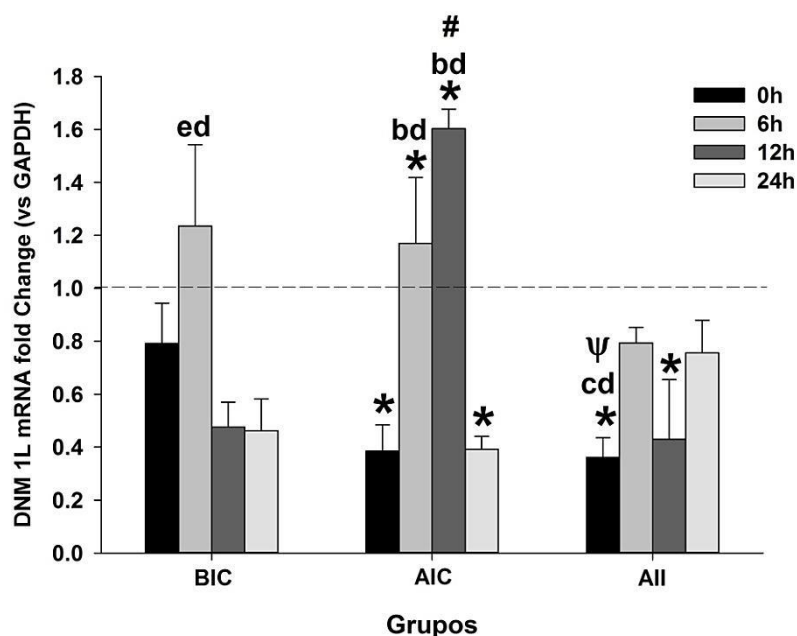


Figura 10. Expressão gênica do *Dnm1l* no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos não treinado (CONTROLE), treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. A linha tracejada indica a expressão do grupo de referência (i.e., grupo não exercitado, denominado aqui de grupo controle). (*) Diferente do controle; (b) Diferente de 0h no mesmo grupo; (c) Diferente de 6h dentro do mesmo grupo; (d) Diferente de 24h no mesmo grupo; (e) Diferente de 12h no mesmo grupo; (Ψ) Diferente de BIC no mesmo momento; (#) Diferente dos demais grupos no mesmo momento.

A expressão gênica de *PARK2*, que codifica a proteína parkina, foi significativamente maior no grupo AIC imediatamente após o exercício em relação ao controle e as medidas de 6h e 24h após o exercício, enquanto o grupo AII apresentou expressão significativamente menor em 12h após o exercício, quando comparado ao controle, 0h e 24h após o exercício. A comparação entre grupos mostrou que a expressão foi maior na medida imediatamente após o exercício no grupo AIC em relação os demais grupos, e significativamente menor na medida 12h após o exercício no grupo AII, quando comparados aos demais grupos (Figura 11).

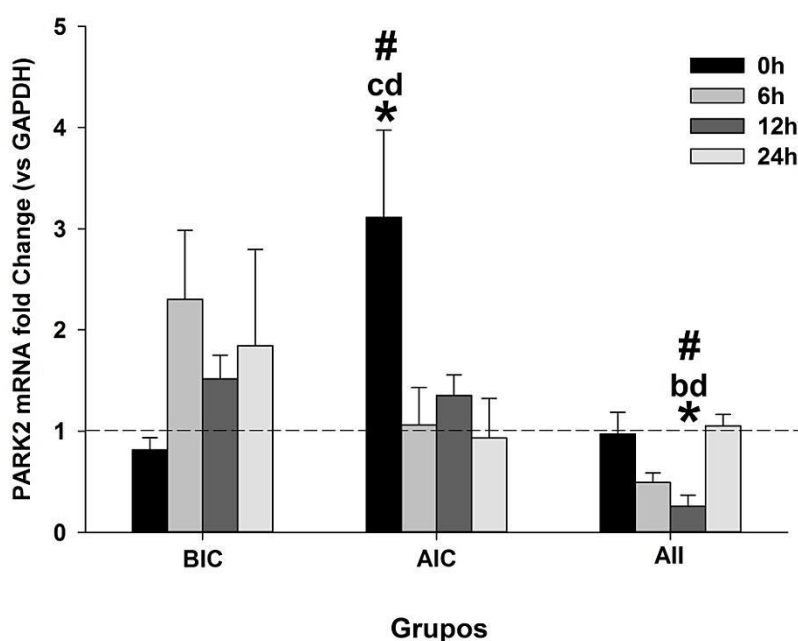


Figura 11. Expressão gênica do *Park2* no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos não treinado (CONTROLE), treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. A linha tracejada indica a expressão do grupo de referência (i.e., grupo não exercitado, denominado aqui de grupo controle). (*) Diferente do controle; (b) Diferente de 0h no mesmo grupo; (c) Diferente de 6h no mesmo grupo; (d) Diferente de 24h no mesmo grupo; (#) Diferente dos demais grupos no mesmo momento.

A expressão gênica de *Nos2*, que codifica a enzima NOS, foi significativamente maior em relação ao grupo controle imediatamente após o exercício no grupo AIC e em 6h após o exercício no grupo AII. Nas comparações entre os momentos dentro de cada grupo observou-se que a expressão do gene estava significativamente maior imediatamente após o exercício no grupo AIC quando comparado aos demais momentos (i.e., 6h, 12 e 24h), já no grupo AII a expressão estava significativamente menor em 12h, quando comparado a 6h após o exercício. Nas comparações entre grupos apenas o grupo AIC apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos, apresentando maior expressão deste gene (Figura 12).

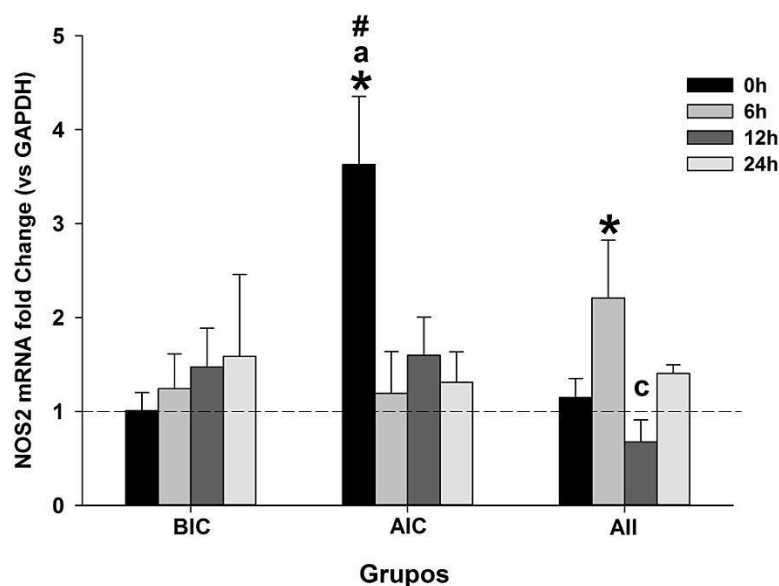


Figura 12. Expressão gênica do *Nos2* no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos não treinado (CONTROLE), treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. A linha tracejada indica a expressão do grupo de referência (i.e., grupo não exercitado, denominado aqui de grupo controle). (*) Diferente do controle; (a) Diferente dos demais momentos no mesmo grupo; (c) Diferente de 6h no mesmo grupo; (#) Diferente dos demais grupos no mesmo momento.

A expressão gênica de *Nfe2l2*, que codifica o fator de transcrição Nrf2, foi significativamente maior em relação ao grupo controle imediatamente após o exercício no grupo AIC, enquanto nos grupos BIC e AII a expressão foi significativamente maior 24h após o exercício. A maior expressão imediatamente após o exercício, observada no grupo AIC, também foi significativa em relação aos demais momentos dentro do mesmo grupo, bem como aos demais grupo (i.e., BIC e AII) no mesmo momento. Quanto ao grupo BIC, a maior expressão observada 24h após o exercício foi significativa em relação aos demais momentos dentro do mesmo grupo e significativamente maior em relação ao grupo AIC no mesmo momento (i.e., 24h), enquanto que a maior expressão observada em 24h no grupo AII foi significativa em relação à medida imediatamente após o exercício (i.e., 0h) e em relação ao grupo AIC no mesmo momento (i.e., 24h) (Figura 8).

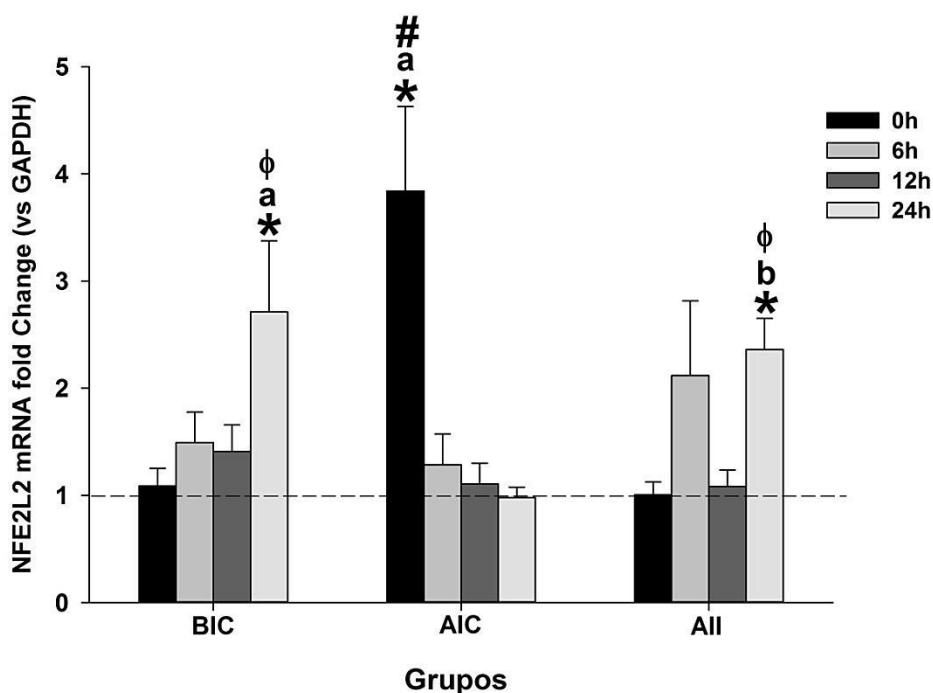


Figura 13. Expressão gênica do *Nfe2l2* no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos não treinado (CONTROLE), treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. A linha tracejada indica a expressão do grupo de referência (i.e., grupo não exercitado, denominado aqui de grupo controle) (*) Diferente do controle; (a) Diferente dos demais momentos no mesmo grupo; (b) Diferente de 0h no mesmo grupo; (Φ) Diferente de AIC no mesmo momento.

A expressão gênica de *Gpx1*, que codifica a enzima GPx1, foi significativamente maior em relação ao grupo controle imediatamente após o exercício no grupo AIC, enquanto no grupo AII a expressão foi significativamente maior 24h após o exercício. A maior expressão imediatamente após o exercício, observada no grupo AIC, também foi significativa em relação aos demais momentos dentro do mesmo grupo, bem como aos demais grupos (i.e., BIC e AII) no mesmo momento. De modo similar, no grupo AII, a maior expressão observada 24h após o exercício foi significativa em relação aos demais momentos dentro do mesmo grupo e significativamente maior em relação aos demais grupos (i.e., BIC e AIC) no mesmo momento (i.e., 24h) (Figura 9).

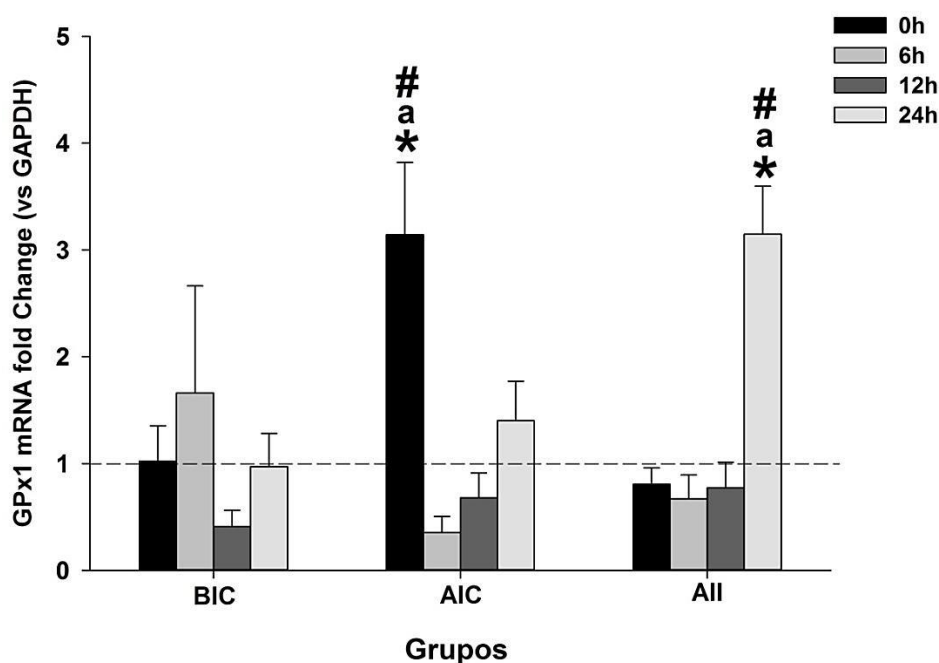


Figura 14. Expressão gênica do *GPx1* no músculo gastrocnêmio dos animais dos grupos não treinado (CONTROLE), treinados em baixa intensidade contínuo (BIC), treinados em alta intensidade contínuo (AIC) e treinados em alta intensidade intervalado (AII) e sacrificados nos respectivos tempos 0h, 6h, 12h e 24h após realização de 1 única sessão de treinamento. A linha tracejada indica a expressão do grupo de referência (i.e., grupo não exercitado, denominado aqui de grupo controle). (*) Diferente do controle; (a) Diferente dos demais momentos no mesmo grupo; (#) Diferente dos demais grupos no mesmo momento.

3.2.4 Discussão

O presente estudo objetivou investigar a influência de 3 protocolos de exercício físico com diferentes parâmetros de intensidade, duração e forma de execução (BIC, AIC e AII) sobre a dinâmica mitocondrial e balanço redox em músculo gastrocnêmio de camundongos ao longo de 24 horas após sua execução. Os resultados deste estudo indicam que os protocolos de exercício investigados induzem diferentes respostas, sendo constatado que, apesar de divergentes quanto à intensidade e duração, os protocolos BIC e AII induzem respostas similares na dinâmica mitocondrial e balanço redox ao longo das primeiras 24h após a realização dos protocolos de treino. O protocolo AII, parece ser o mais eficiente quanto a induzir adaptações agudas em nível mitocondrial e de defesa antioxidante, enquanto o protocolo AIC parece proporcionar um estímulo ineficiente, se comparado aos demais protocolos testados.

Devido ao grande volume de resultados a serem discutidos, esta seção será subdividida da mesma forma que a seção dos resultados.

Lactato, atividade Enzimática (citrato sintase, catalase e GPx) e TBARS

A plasticidade das células musculares após a realização de exercícios resulta da sua capacidade de detectar sinais oriundos de estressores mecânicos, metabólicos, neuronais e hormonais, e por meio de diversas vias transmiti-los até o genoma muscular visando adaptar-se para enfrentar novos insultos, como o próprio exercício (192). O exercício pode ativar, de forma imediata, muitas cascatas de sinalização que levam à ativação de fatores de transcrição de múltiplos genes nas horas subsequentes, o que pode ser mantidos ao longo de dias (193).

Considerando as características do modelo de exercício usado neste estudo (i.e., nado forçado), os estressores metabólicos, que incluem as mudanças no pH, temperatura, saturação de oxigênio, status energético intramuscular, bem como radicais livres produzidos durante a contração muscular, são a principal fonte de estímulo para iniciar a cascata de eventos moleculares que se seguem ao exercício (201,209,232). Dentro deste contexto, a medida do lactato sanguíneo imediatamente após o exercício e as medidas de TBARS e CS até as primeiras 6h após o exercício podem trazer informações relevantes para o entendimento dos eventos moleculares subsequentes ao exercício.

A medida da lactacidemia demonstrou um comportamento esperado para as características de cada protocolo de exercício, visto que foi maior nos exercícios de alta intensidade (AIC e AII), quando comparado ao exercício de baixa intensidade (BIC). Adicionalmente, a maior lactacidemia no grupo AII pode ser justificada pela intensidade maior em relação ao AIC (AIC: 5% da MC x AII: 10% da MC) e pela menor duração (AIC: 15 min. x AII: 7 min) e pelo perfil intervalado do protocolo AII, o que favorece a predominância da ressíntese de ATP pela via glicolítica (233–235).

Considerando que o lactato intramuscular e a lactacidemia não apresentam um equilíbrio perfeito e que vários fatores podem interferir no surgimento do lactato no plasma sanguíneo após o exercício (236), a lactacidemia não deve ser entendida como uma medida direta da produção intramuscular, no entanto, esta mantém uma excelente relação com a intensidade do exercício. Desta forma, a maior lactacidemia nos grupos de alta intensidade observados neste estudo deve ser interpretado como um indicador que confirma o perfil dos protocolos de exercício aplicados.

No contexto da bioenergética durante a realização de exercícios, é importante ressaltar que o metabolismo glicolítico e demais fontes de ressíntese de ATP por meios anaeróbios (e.g., fosfocreatina e mioquinase) são predominantes nos primeiros segundos de exercícios intervalados de alta intensidade, mas reduzem sua contribuição à medida que o período de

contração é mantido. Os resultados de Bogdanis e colaboradores (1998) já demonstravam que, durante um sprint máximo sustentado por 20 segundos, a capacidade de utilização de ATP advindo da glicólise anaeróbia reduz em ~35% após o 10º segundo da tarefa, em contrapartida, observaram um aumento estimado da contribuição do metabolismo aeróbico da ordem de ~27% (237).

No presente estudo foram aplicados 14 ciclos de 20 segundos de nado forçado com carga adicional e 10 segundos de repouso entre estes, sendo portanto esperado um aumento progressivo da contribuição do metabolismo aeróbico ao longo da tarefa, visando a sustentação da mesma. Desta forma, os elevados valores de atividade da enzima CS nos grupos submetidos a exercício de alta intensidade se justificam pela grande demanda metabólica, somada à incapacidade das vias de ressíntese de ATP por meio anaeróbico se manter por longos períodos de tempo. De modo especial, a atividade da CS significativamente maior no grupo AII em relação ao BIC imediatamente após o protocolo de exercício corrobora com evidências prévias de que o exercício de alta intensidade intervalado tem considerável dependência do metabolismo oxidativo, especialmente com ciclos de atividade iguais ou superiores a 20 segundos (233,237).

A maior atividade da enzima CS em relação à condição controle foi sustentada por um período de tempo superior nos grupos de alta intensidade (AIC e AII), de modo especial, no grupo AII está se manteve significativamente superior até o a medida de 24h após o exercício, o que pode indicar um aumento da densidade mitocondrial, hipótese plausível quando se considera o perfil de expressão de genes envolvidos na dinâmica mitocondrial, conforme será discutido adiante.

A medida de TBARS, usado no presente estudo como um indicador de peroxidação lipídica, mostrou que os protocolos de alta intensidade induziram maior estresse oxidativo quando comparados ao grupo BIC, estado que se manteve até 24h e 6h pós o exercício nos grupos AIC e AII, respectivamente. Apesar da maior intensidade imposta no grupo AII, a medida de TBARS apresentou uma redução progressiva ao longo do tempo de modo similar ao grupo BIC, diferentemente do grupo AIC, que apresentou um declínio somente entre as medidas de 12 e 24h, não havendo retorno às condições do grupo controle até as 24h estudadas. Estes resultados chamam atenção para capacidade dos exercícios de alta intensidade em induzir estresse oxidativo em maior magnitude, ao passo que a inserção de intervalos durante sua execução pode minimizar este efeito ao longo das horas subsequentes à execução do exercício, o que pode proporcionar estímulo suficiente para iniciar a expressão de genes relacionados com a adaptação celular ao exercício, mas também um ambiente

adequado para que as informações contidas nestes genes sejam devidamente lidos em nível ribossomal, culminando na efetiva síntese das proteínas alvo (238,239).

Apesar de um ambiente pro-oxidante ser importante para o bom funcionamento do retículo endoplasmático (RE), a manutenção de um elevado estado pro-oxidante em nível celular pode comprometer a adequada síntese de proteína, o que parece envolver a homeostase do íon cálcio, tanto em nível de RE, quanto em nível endoplasmático (239). Adicionalmente, uma grande carga de proteínas no RE aumenta a probabilidade do acúmulo de proteínas com erros no processo de dobramento (240), o que inicia o que é denominado *unfolded protein response* (UPR), processo que culmina, por ao menos três vias, dentre as quais está a atenuação da taxa de tradução, visando reduzir a entrada de proteínas no RE. Desta forma, a manutenção do estado altamente oxidante nos músculos dos animais submetidos ao protocolo AIC pode ter prejudicado a adaptação aguda ao exercício, limitando a tradução e então, efetiva síntese de proteínas citoprotetoras e envolvidas na dinâmica mitocondrial.

No que tange o controle do estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 , as enzimas CAT e GPx são relevantes, visto que são peroxidases com propriedades enzimáticas complementares (241–243). Enquanto a enzima catalase apresenta uma cinética excelente em ambientes com altas concentrações de H_2O_2 , a GPx apresenta característica oposta. Desta forma, apesar de ambas reduzirem H_2O_2 em diferentes concentrações, a catalase parece ser importante para condições que induzem elevações consideráveis de H_2O_2 intracelular, como durante o exercício, enquanto a GPx parece ser importante em condições basais, o que representa a maior parte do tempo, dada a incapacidade de manutenção da execução de exercício físico por períodos muito longos de tempo, especialmente os exercícios de alta intensidade (243).

No presente estudo foi observado que a atividade das enzimas catalase e GPx se mantiveram superiores à condição controle ao longo das 24h após o exercício em todos os grupos, mas é interessante notar que a atividade da enzima catalase se encontra alta imediatamente após o exercício e se mantém assim ao longo das 24h nos grupos AIC e AII, enquanto o grupo BIC apresenta atividade significativamente maior em 12 e 24h quando comparado a 0h e 6h, caracterizando um segundo aumento da atividade da referida enzima. Este segundo aumento pode representar uma adaptação ao exercício, possivelmente um aumento da síntese da enzima catalase.

Anderson & Neuffer (2006) demonstraram que as fibras musculares do tipo II, as quais são predominantes no músculo gastrocnêmio, possuem propriedades que potencializam a produção de H_2O_2 intracelular (244). Considerando que o recrutamento de fibras musculares

do tipo II é diretamente proporcional à intensidade do exercício, as maiores medidas de TBARS observadas nos grupos de alta intensidade (AIC e AII) podem refletir esta característica. No mesmo sentido, as medidas de atividade da catalase mantida alta ao longo de todo o período de análise após o exercício (i.e., 24h) podem estar relacionadas a este fato, não obstante, as medidas mais tardias, de 12 e 24h, também podem indicar uma adaptação aguda, da mesma forma que observado no grupo BIC.

Curiosamente, a atividade da enzima GPx apresentou um comportamento crescente ao longo das 24h de acompanhamento após o exercício, o que foi perceptível em todos os grupos. No entanto, apesar da maior intensidade durante sua execução, o protocolo AII parece ter induzido adaptações de maior magnitude no que tange a atividade da GPx, de modo que, os valores significativamente mais altos em 24h podem indicar já uma adaptação aguda por aumento da síntese desta enzima, o que conferiria maior citoproteção contra estresse oxidativo em condições basais ou em exercícios de baixa intensidade e não apenas em condições de exercício de alta intensidade.

Expressão gênica

A intensidade, a duração e a forma de execução (i.e., contínua ou intervalada) podem influenciar diretamente na disponibilidade de ATP, bem como na quantidade de ROS nos músculos exercitados (13) uma vez que diferentes tipos de exercício diferem em seus respectivos requisitos de energia, níveis de consumo de oxigênio e tensões mecânicas impostas aos tecidos (210,243,245). Exercícios de alta intensidade demandam maior gasto energético, por essa razão, maior consumo de ATP e produção de ROS (13), o que pode potencializar as respostas imediatas ao exercício, ao passo que, podem gerar uma maior magnitude de dano molecular decorrente das ROS, o que retardaria a consolidação das respostas adaptativas.

Nossos dados suportam a ideia de que uma sessão aguda de exercício foi capaz de aumentar a expressão de genes de fatores transcricionais envolvidos na biogênese mitocondrial, como o gene *Ppargc1a*, que codifica a proteína PGC1- α , e o gene *Nrf2l2*, que codifica a proteína Nrf-2, este último também envolvido na resposta antioxidante (63,217,246,247). Conforme observado e previamente discutido, o exercício agudo promoveu mudança temporárias no equilíbrio redox em direção a um estado mais oxidado através da produção de ROS e aumento de TBARS (Figura 5) (243,248). Ainda que os mecanismos moleculares envolvidos na interação entre PGC-1 α e Nrf2 não tenham sido completamente elucidados, especula-se que a via de um desses dois fatores de transcrição possa ser

influenciada pela outra, provavelmente porque ambas são mediadas pela produção de ROS (8,15,249–253).

A biogênese mitocondrial é regulada principalmente pelo PGC1- α (67,254), desta forma, o aumento da expressão do gene *Pparg1a* sugere uma tentativa em aumentar a densidade mitocondrial, e assim, a homeostase energética das células musculares. No presente estudo a expressão do gene *Pparg1a* foi significativamente maior imediatamente e 6h após o exercício no grupo AIC, mas não nos grupos BIC e AII, que apresentaram aumentos significativos nas medidas de 6h, 12h e 24h após o exercício.

O pico na expressão do gene *Pparg1a* observado imediatamente e 6h após o exercício no grupo AIC pode estar relacionado a um maior estresse oxidativo associado a este protocolo, que aplicou uma alta intensidade mantida por um período de 15 minutos, o que pode ser relacionado às medidas de TBARS significativamente altas até 6h após o exercício. Além disso, em células musculares esqueléticas, o aumento da Ca^{++} intracelular causado pela contração muscular leva à ativação do complexo cálcio/calmodulina e à ativação de CREB para promover a transcrição do gene da proteína PGC-1 α . Considerando que, sob condições de estresse oxidativo observa-se perda da homeostase do Ca^{++} em nível de retículo sarcoplasmático, caracterizado por aumento da liberação e redução da recaptção deste íon (255), pode-se sugerir que o perfil de alta intensidade mantida sem intervalos por 15 minutos do protocolo AIC induziu a maior estresse oxidativo com consequente perda da homeostase do íon Ca^{++} , potencializando o estímulo para a expressão do gene *Pparg1a* imediatamente após o exercício e de forma significativamente maior que os demais grupos.

Exercícios de baixa intensidade e longa duração são reconhecidos como excelentes modelos de treinamento para aumento da resistência aeróbica, o que perfaz adaptações em nível muscular esquelético, além das adaptações cardiorrespiratórias (2,191,256). Desta forma, uma resposta direcionada à biogênese mitocondrial seria esperada no protocolo BIC, o que se confirmou pelo aumento da expressão do gene *Pparg1a* 6h após o exercício, se mantendo elevado até as 24h após o exercício. Este mesmo comportamento foi observado no AII chamando a atenção, visto que são os protocolos de exercício com maior discrepância entre si, no entanto, protocolos de alta intensidade intervalados tem se mostrado eficientes em induzir adaptações mitocondriais (13,250,257).

Nossos resultados apoiam a ideia de que protocolos de alta intensidade intervalados promovam maior fosforilação de AMPK quando comparada com exercícios contínuos (251,258–260) e sabe-se que tanto AMPK, quanto MAPK e ROS são importantes mensageiros celulares da ativação de *Pparg1a* (221,248). Alguns estudos também

demonstraram que o lactato regula positivamente a expressão e o conteúdo de *Pparg1a* (261,262). Somado a isso, nossos dados ainda suportam a ideia de que por se tratar de um exercício intervalado, entre os sprints ocorra mudança na predominância das vias metabólicas, com ativação de vias oxidativas e maior ressíntese de ATP à medida que a tarefa se prolonga (263). De maneira semelhante, o grupo submetido ao treinamento de baixa intensidade também apresentou expressão tardia, isso pode relacionar-se com a menor requisição de ATP ou capacidade de ressíntese de ATP durante o exercício e, conseqüentemente menor acúmulo de metabólitos intermediários de baixo potencial energético (e.g., AMP) que possuem papéis regulatórios (264).

Reconhecidamente, as alterações na atividade transcricional do *Pparg1a* induz as respostas fisiológicas que preparam a célula para atender às demandas energéticas do organismo, incluindo o aumento da biogênese mitocondrial, melhor utilização de substrato e respiração celular (60,63,265,266). A expressão do *Pparg1a* e a atividade da citrato sintase são utilizados como biomarcadores celulares para avaliar a adaptação oxidativa, bem como para a biogênese e densidade mitocondrial no musculo esquelético (267). Os resultados deste estudo somam-se a essas evidências científicas, visto que foi observado medidas de atividade da enzima citrato sintase significativamente maiores em relação à condição controle apenas no grupo AII, o que foi estatisticamente igual ao grupo BIC, mas superior ao grupo AIC.

É importante frisar que aumentos na expressão gênica não garantem o efetivo aumento da síntese da proteína que este codifica, visto que condições de acúmulo de proteínas no RE e grande estresse oxidativo podem inibir a tradução em nível dos ribossomos (239,240), conforme já discutido anteriormente. Este mecanismo pode ajudar a justificar a ausência de aumento da atividade da CS na medida de 24h após o exercício nos animais do grupo AIC, o que pode ser reforçado pelos resultados da expressão dos demais genes relacionados à dinâmica mitocondrial.

O grupo AIC apresentou um comportamento similar na expressão dos genes *Mfn2* e *Pparg1a*, com um pico imediatamente após o exercício. Diferentemente da expressão do *Pparg1a*, a expressão do gene *Mfn2* demonstrou um comportamento divergente entre os grupos BIC e AII, sendo um aumento significativo no grupo AII imediatamente e 6h após o exercício, se mantendo em valores acima da condição controle, enquanto o grupo BIC apresentou uma tendência de aumento da expressão deste gene ao longo dos momentos estudados após o exercício. Adicionalmente, em 6h, a expressão do gene *Mfn2* foi significativamente maior no grupo AII, quando comparado ao BIC, que neste momento apresentava valores médios indicativos de repressão da expressão deste gene.

De fato, o evento de fusão mitocondrial leva ao aumento da rede mitocondrial, o qual está associado a condições de adaptação às demandas energéticas celulares e, por esta razão, considerado uma resposta adaptativa positiva. Os resultados da expressão de *Mfn2*, juntamente com os da expressão da *Ppargc1a* indicam que o protocolo AII parece induzir uma resposta mais efetiva no sentido de aumento da quantidade e qualidade mitocondrial, o que é corroborado pela maior atividade da enzima CS na medida de 24h.

No sentido oposto à fusão mitocondrial, os eventos de fragmentação (fissão) mitocondrial e autofagia (mitofagia) são inter-relacionados e descritos na literatura como eventos protetores à célula, por eliminar mitocôndrias disfuncionais (50,51). Os genes *Dnm1L* e *Park2* codificam a síntese das proteínas Drp1 e Parkina, as quais estão diretamente relacionados com eventos de fissão e mitofagia respectivamente. Neste contexto, o protocolo AII foi o único que induziu repressão dos genes *Dnm1l* e *Park2* ao longo das 24h após o exercício. O protocolo AII foi o de maior intensidade dentre os estudados, o que tenderia a desencadear maior demanda energética, desta forma, seria esperado que ocorresse repressão da expressão destes genes (268). Curiosamente, maior sobrecarga e dano mitocondrial seriam esperados em condições de exercício de alta intensidade, o que ativaria vias do aumento da expressão dos referidos genes, no entanto, a menor duração do protocolo e o fato de ser realizado de forma intervalada podem ter protegido contra danos mitocondriais excessivos. De fato, o grupo AIC apresentou aumento significativo da expressão do gene *Dnm1l* em 6 e 12h após a realização do protocolo de exercício, confirmando que a forma de execução do exercício de alta intensidade por interferir diretamente no direcionamento da dinâmica mitocondrial.

O óxido nítrico é uma espécie reativa de nitrogênio com reconhecida influência sobre o tecido muscular esquelético, sendo esta influência direta e indireta (269,270), induzindo adaptações vasculares devido ao seu potencial vasodilatador. O gene *Nos2* codifica a isoforma indutível da enzima iNOS, a qual tem sua expressão aumentada em condições inflamatórias. Curiosamente, o grupo AII apresentou aumento significativo da expressão desta enzima 6h após o exercício, com repressão de sua expressão em 12h. Estes resultados não estão claros, mas podem indicar uma resposta inicial direcionada ao aumento do fluxo sanguíneo local, melhora no transporte de glicose (270) ou mesmo auxiliar nas adaptações mitocondriais, visto que o óxido nítrico pode favorecer a expressão do gene *Ppargc1a* de maneira dependente da sinalização por CREB, ou seja, direcionados a atender à grande demanda energética subsequente ao protocolo AII. O grupo AIC apresentou pico de expressão imediatamente após o exercício, o que pode estar relacionado ao grande estresse metabólico e oxidativo induzido

por este protocolo de exercício, que aplicou alta intensidade por um período mais prolongado e de forma contínua.

Os últimos 2 genes analisados neste estudo, *Nfe2l2* e *Gpx1*, estão relacionados à defesa antioxidante. O aumento da expressão do gene GPx1 ocorrido no grupo AII parece estar diretamente relacionado ao aumento da expressão do gene *Nfe2l2*, que codifica o fator de transcrição Nrf2, o qual regula a expressão de genes de mais de 200 proteínas citoprotetoras, especialmente enzimas antioxidantes, dentre as quais se encontra a GPx (157).

O gene *Nfe2l2* tem dupla importância para a interpretação dos resultados deste estudo, pois é capaz de influenciar tanto a defesa antioxidante, quanto a dinâmica mitocondrial (247,271,272). A este respeito, o grupo AIC apresentou aumento significativo da expressão do gene *Nfe2l2* imediatamente após o exercício, o que pode estar diretamente relacionado à magnitude de estresse oxidativo acumulado por esta modalidade de treino. Apesar de opostos em relação à intensidade e duração, os grupos BIC e AII apresentaram um comportamento similar na expressão do gene *Nfe2l2*, que se caracterizou por um aumento significativo em 24h após o exercício, sendo este significativamente maior nos grupos de alta intensidade, quando comparado ao de baixa intensidade.

Sabe-se que eventos pós-transcricionais podem interferir diretamente na adaptação celular após o exercício, como é o caso do PGC-1 α , que é amplamente regulada por mecanismos pós-transcricionais, a citar a síntese proteica e translocação nuclear de PGC-1 α . Embora a análise destes eventos não tenham sido realizadas no presente trabalho, cabe ressaltar que os estímulos transitórios e repetidos de mRNA precedem o aumento das proteínas transcricionais e mitocondriais durante o treinamento no músculo esquelético humano (217) e também que o estímulo do exercício físico não se limita a induzir a expressão da proteína PGC-1 α , mas também sua translocação para os compartimentos específicos estimulando a transcrição dos genes mitocondriais e nucleares, bem como a replicação do DNA mitocondrial (273). Este contexto se aplica a diversas proteínas codificadas pelos genes aqui estudados.

Em conjunto estes resultados permitem afirmar que a sinalização molecular induzida pelo protocolo BIC e AII deste estudo podem proporcionar condições favoráveis a adaptações mais eficientes no que tange a defesa antioxidante e a dinâmica mitocondrial, visto que a intensidade, a duração e a forma de execução (i.e., contínua ou intervalada) podem influenciar diretamente na disponibilidade de ATP, bem como na quantidade de ROS nos músculos exercitados (13). Desta forma, exercícios de alta intensidade demandam maior gasto energético, por essa razão, maior consumo de ATP e produção de ROS (13), o que pode

potencializar as respostas imediatas ao exercício, ao passo que, podem gerar uma maior magnitude de dano molecular decorrente das ROS, o que retardaria a consolidação das adaptações induzidas pelo exercício.

Dentro deste contexto, o uso de intervalos durante a execução de exercícios de alta intensidade poderia proporcionar condições adequadas para minimizar os sinais de dano oxidativo, especialmente em nível mitocondrial, visto que houve repressão da expressão de genes relacionados a fissão e mitofagia após o protocolo AII, além de potencializar a sinalização para vias de biogênese e fusão mitocondrial, que em conjunto ajudam a manter a rede mitocondrial.

Limitações do estudo

O presente estudo limitou-se a analisar a expressão gênica dos genes relacionados com a dinâmica mitocondrial e balanço redox, contudo sabe-se que mesmo sessões agudas de treino são capazes de aumentar a síntese de algumas proteínas destas vias regulatórias, mas a realização destas análises não foram realizadas.

3.2.5 Fontes de financiamento

Este estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) (RED038/2014) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (462401/2014-6).

REFERENCIAS

1. Viña J, Sanchis-Gomar F, Martínez-Bello V, Gómez-Cabrera MC. Exercise acts as a drug; The pharmacological benefits of exercise. *Br J Pharmacol*. 2012;167(1):1–12.
2. Fletcher GF, Landolfo C, Niebauer J, Ozemek C, Arena R, Lavie CJ. Reprint of: Promoting Physical Activity and Exercise. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2018;72(23):3053–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109718388570>
3. Singh R. The importance of exercise as a therapeutic agent. *Malays J Med Sci* [Internet]. 2002 Jul;9(2):7–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844219>
4. Di Meo S, Napolitano G, Venditti P. Mediators of Physical Activity Protection against ROS-Linked Skeletal Muscle Damage. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):1–38.
5. Fahey T, Insel P, Roth T. *Fit & Well: Core Concepts And Labs In Physical Fitness And Wellness*. 13th ed. McGraw Hill, editor. Nova Iorque; 2018.
6. Dunstan DW, Daly RM, Owen N, Jolley D, Vulikh E, Shaw J, et al. Home-based resistance training is not sufficient to maintain improved glycemic control following supervised training in older individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2005;28(1):3–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616225>
7. HASKELL WL, LEE I-M, PATE RR, POWELL KE, BLAIR SN, FRANKLIN BA, et al. Physical Activity and Public Health. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2007 Aug 28;39(8):1423–34. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.185649>
8. Tjønnå AE, Lee SJ, Rognum Ø, Stølen TO, Bye A, Haram PM, et al. Aerobic Interval Training Versus Continuous Moderate Exercise as a Treatment for the Metabolic Syndrome. *Circulation* [Internet]. 2008 Jul 22;118(4):346–54. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.772822>
9. Cockcroft EJ, Williams CA, Tomlinson OW, Vlachopoulos D, Jackman SR, Armstrong N, et al. High intensity interval exercise is an effective alternative to moderate intensity exercise for improving glucose tolerance and insulin sensitivity in adolescent boys. *J Sci Med Sport* [Internet]. 2015;18(6):720–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsams.2014.10.001>
10. Kong Z, Fan X, Sun S, Song L, Shi Q, Nie J. Comparison of high-intensity interval training and moderate-to-vigorous continuous training for cardiometabolic health and

- exercise enjoyment in obese young women: A randomized controlled trial. *PLoS One*. 2016;11(7):1–16.
11. Cuddy TF, Ramos JS, Dalleck LC. Reduced exertion high-intensity interval training is more effective at improving cardiorespiratory fitness and cardiometabolic health than traditional moderate-intensity continuous training. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(3).
 12. Gibala MJ, Little JP, van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, et al. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: Similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol*. 2006;575(3):901–11.
 13. MacInnis MJ, Gibala MJ. Physiological adaptations to interval training and the role of exercise intensity. *J Physiol*. 2017;595(9):2915–30.
 14. Weston M, Taylor KL, Batterham AM, Hopkins WG. Effects of Low-Volume High-Intensity Interval Training (HIT) on Fitness in Adults : A Meta-Analysis of Controlled and Non-Controlled Trials. 2014;1005–17.
 15. Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans : Cause and consequences. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2011;51(5):942–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.009>
 16. Wang Y, Nartiss Y, Steipe B, McQuibban GA, Kim PK. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy*. 2012;8(10):1462–76.
 17. Willems PHGM, Rossignol R, Dieteren CEJ, Murphy MP, Koopman WJH. Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metab* [Internet]. 2015;22(2):207–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.006>
 18. Ogonovszky H, Sasvári M, Dosek A, Berkes I, Kaneko T, Tahara S, et al. The Effects of Moderate , Strenuous , and Overtraining on Oxidative Stress Markers and DNA Repair in Rat Liver. 2005;186–95.
 19. Radak Z, Taylor AW, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress : From muscle to brain. 2001;(October 2014).
 20. Trewin A, Berry B, Wojtovich A. Exercise and Mitochondrial Dynamics: Keeping in Shape with ROS and AMPK. *Antioxidants*. 2018;7(1):7.
 21. Bouchez C, Devin A. Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP / PKA Signaling Pathway. 2019;
 22. Yoo SZ, No MH, Heo JW, Park DH, Kang JH, Kim JH, et al. Effects of acute exercise

- on mitochondrial function, dynamics, and mitophagy in rat cardiac and skeletal muscles. *Int Neurourol J*. 2019;23(Suppl 1):S22–31.
23. Chen H, Chan DC. Mitochondrial Dynamics in Mammals. *Curr Top Dev Biol* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2019 May 31];59:119–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0070215304590051?via%3Dihub>
 24. Noguchi M, Kasahara A. Mitochondrial dynamics coordinate cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2018;500(1):59–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.094>
 25. Taylor FJR. Implications and Extensions of the Serial Endosymbiosis Theory of the Origin of Eukaryotes. *Taxon*. 1974;23(2–3):229–58.
 26. Andersson SGE, Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG, Whatley FR, Van Der Giezen M, et al. On the origin of mitochondria: A genomics perspective. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2003;358(1429):165–79.
 27. Lang BF, Gray MW, Burger G. Mitochondrial Genome Evolution and the Origin of Eukaryotes. *Annu Rev Genet* [Internet]. 1999 Dec;33(1):351–97. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genet.33.1.351>
 28. Gray MW. Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection. *Nature*. 1998;396(6707):109–10.
 29. Gray MW, Doolittle WF. Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev*. 1982;46(1):1–42.
 30. Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2012;16(10):1150–80. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2011.4085>
 31. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012;13(9):566–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3412>
 32. Chen H, Chan DC. Mitochondrial Dynamics in Mammals. *Curr Top Dev Biol*. 2004;59:119–44.
 33. Vögtle F-N, Burkhart JM, Rao S, Gerbeth C, Hinrichs J, Martinou J-C, et al. Intermembrane Space Proteome of Yeast Mitochondria. *Mol Cell Proteomics*. 2012;11(12):1840–52.
 34. Lee H, Yoon Y. Mitochondrial Fission: Regulation and ER Connection. *Mol Cells*. 2014;37(2):89–94.

35. Fox TD. Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics*. 2012;192(4):1203–34.
36. Ott C, Ross K, Straub S, Thiede B, Gotz M, Goosmann C, et al. Sam50 Functions in Mitochondrial Intermembrane Space Bridging and Biogenesis of Respiratory Complexes. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2012;32(6):1173–88. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.06388-11>
37. Guo R, Zong S, Wu M, Gu J, Yang M. Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell* [Internet]. 2017;170(6):1247-1257.e12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050>
38. Stroud DA, Ryan MT. Mitochondria: Organization of respiratory chain complexes becomes cristae-lized. *Curr Biol* [Internet]. 2013;23(21):R969–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.035>
39. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: In sickness and in health. *Cell* [Internet]. 2012;148(6):1145–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
40. Osellame LD, Blacker TS, Duchen MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2012;26(6):711–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>
41. Wojtczak L, Zabłocki K. Mitochondria w życiu, chorobie i śmierci komórki. *Post Bioch* [Internet]. 2008;54(2):129–41. Available from: http://www.postpybiochemii.pl/pdf/2_2008/01_2_2008.pdf
42. WILLIAMSON, COOPER. REGULATION OF THE CITRIC ACID CYCLE IN MAMMALIAN SYSTEMS. *FEBS Lett*. 1980;117(August).
43. Henze K, Martin W. How do mitochondrial genes get into the nucleus? *Trends Genet*. 2001;17(7):383–7.
44. Wiedemann N, Pfanner N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu Rev Biochem*. 2017;86(1):685–714.
45. Mai N, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Lightowlers RN. The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2017;367(1):5–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-016-2456-0>
46. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* [Internet]. 2015;13(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
47. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* [Internet].

- 1981 Apr;290(5806):457–65. Available from: <http://www.nature.com/articles/290457a0>
48. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem.* 2010;47:69–84.
 49. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 2018;62(3):341–60.
 50. Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA. Mitochondria and Endothelial Function. *Circ Res* [Internet]. 2013 Apr 12;112(8):1171–88. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.111.300233>
 51. Wei H, Liu L, Chen Q. Selective removal of mitochondria via mitophagy: Distinct pathways for different mitochondrial stresses. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2015;1853(10):2784–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.013>
 52. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. 2007;838–48.
 53. Walker JE. Determination of the structures of respiratory enzyme complexes from mammalian mitochondria. *BBA - Mol Basis Dis.* 1995;1271(1):221–7.
 54. Shokolenko IN, Alexeyev MF. Mitochondrial DNA: A disposable genome? *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2015 Sep;1852(9):1805–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443915001696>
 55. Virbasius J V., Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: A potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(4):1309–13.
 56. Scarpulla RC. Nuclear respiratory factors and the pathways of nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Cardiovasc Med.* 1996;6(2):39–45.
 57. Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr.* 2002;1576(1–2):1–14.
 58. Knutti D, Kralli A. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12(8):360–5.
 59. Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, et al. Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* (80-). 1999;286(5443):1368–71.
 60. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of

- transcription coactivators. 2005;1(June):361–70.
61. Puigserver, & Spiegelman BM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1 α (PGC- α): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. 2003;24(1):78–90.
 62. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(7):3820–5.
 63. Pilegaard H, Saltin B, Neufer DP. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2003;546(3):851–8.
 64. Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, et al. Exercise Stimulates Pgc-1 \square Transcription in Skeletal Muscle through Activation of the p38 MAPK Pathway *. 2005;280(20):19587–93.
 65. Wright DC, Geiger PC, Han DH, Jones TE, Holloszy JO. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*. 2007;282(26):18793–9.
 66. Popov D V., Lysenko EA, Vepkhvadze TF, Kurochkina NS, Maknovskii PA, Vinogradova OL. Promoter-specific regulation of PPARGC1A gene expression in human skeletal muscle. *J Mol Endocrinol*. 2015;55(2):159–68.
 67. Michel S, Wanet A, De Pauw A, Rommelaere G, Arnould T, Renard P. Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance. *J Cell Physiol*. 2012;227(6):2297–310.
 68. Popov D V., Lysenko EA, Makhnovskii PA, Kurochkina NS, Vinogradova OL. Regulation of PPARGC1A gene expression in trained and untrained human skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2017;5(23):1–12.
 69. Pilegaard H, Osada T, Andersen LT, Helge JW, Saltin B, Neufer PD. Substrate availability and transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Metabolism*. 2005;54(8):1048–55.
 70. Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: Redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J*. 2015;282(4):647–72.
 71. ALLEN RG, TRESINI M. OXIDATIVE STRESS AND GENE REGULATION. 2000;28(3):463–99.
 72. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial

- biogenesis and function. 2004;(314):357–68.
73. Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* [Internet]. 2000 Jun 1;348 Pt 2:425–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816438>
 74. Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Grassi B, Bottinelli R, Pellegrino MA. The role of alterations in mitochondrial dynamics and PGC-1 α over-expression in fast muscle atrophy following hindlimb unloading. *J Physiol*. 2015;593(8):1981–95.
 75. Ryan JJ, Marsboom G, Fang YH, Toth PT, Morrow E, Luo N, et al. PGC1 α -mediated mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(8):865–78.
 76. Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2008 Sep;1777(9):1092–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272808001436>
 77. Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N, Turnbuu DM. Mammalian mitochondrial genetics: Heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet*. 1997;13(11):450–5.
 78. Twig G, Shirihai OS. The Interplay Between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2010;14(10):1939–51.
 79. Brandt T, Cavellini L, Ku W, Biologie L De, Universite S. A mitofusin-dependent docking ring complex triggers mitochondrial fusion in vitro. 2016;1–23.
 80. Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K. Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion. *J Biochem*. 2003;134(3):333–44.
 81. Ferree A, Shirihai O. Mitochondrial Dynamics: The Intersection of Form and Function. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2012. p. 13–40. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-3573-0_2
 82. Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol* [Internet]. 2015;4:6–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.11.006>
 83. Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M. Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins. Fox TD, editor. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2002 Dec;13(12):4343–54. Available from:

- <http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e02-06-0330>
84. Chandhok G, Lazarou M, Neumann B. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. *Biol Rev*. 2018;93(2):933–49.
 85. Escobar-Henriques M. Mitofusins: Ubiquitylation promotes fusion. *Cell Res* [Internet]. 2014;24(4):387–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2014.23>
 86. Glauser L, Sonnay S, Stafa K, Moore DJ. Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *J Neurochem*. 2011;118(4):636–45.
 87. Liesa M, Bord-d'Água B, Medina-Gómez G, Lelliott CJ, Paz JC, Rojo M, et al. Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1 β . *PLoS One*. 2008;3(10).
 88. Zorzano A. Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal muscle This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 14th International Biochemistry of Exercise Conference – Muscles as Molecular and Metabolic Machines, and has under. *Appl Physiol Nutr Metab* [Internet]. 2009;34(3):433–9. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/H09-049>
 89. Ansgar Santel, Stephan Frank, Brigitte Gaume, Michael Herrler RJY and, Fuller MT. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* [Internet]. 2003 Jul 1;116(13):2763–74. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00479>
 90. Suárez-Rivero J, Villanueva-Paz M, de la Cruz-Ojeda P, de la Mata M, Cotán D, Oropesa-Ávila M, et al. Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases*. 2016;5(1):1.
 91. Cipolat S, de Brito OM, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(45):15927–32.
 92. Chan DC. Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22(1):79–99.
 93. Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, et al. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol*. 2014;204(6):919–29.
 94. Rainbolt TK, Lebeau J, Puchades C, Wiseman RL. Reciprocal Degradation of YME1L and OMA1 Adapts Mitochondrial Proteolytic Activity during Stress. *Cell Rep* [Internet]. 2016 Mar;14(9):2041–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221112471630095X>

95. Sifuentes-Franco S, Pacheco-Moisés FP, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG. The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. *J Diabetes Res*. 2017;2017(c):1–15.
96. Ježek J, Cooper K, Strich R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants*. 2018;7(1):13.
97. Mears JA, Ramachandran R, Alvarez FJD, Zhou L, Francy CA. The Mechanoenzymatic Core of Dynamin-related Protein 1 Comprises the Minimal Machinery Required for Membrane Constriction. *J Biol Chem*. 2015;290(18):11692–703.
98. Sesaki H, Adachi Y, Kageyama Y, Itoh K, Iijima M. In vivo functions of Drp1: Lessons learned from yeast genetics and mouse knockouts. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2014 Aug;1842(8):1179–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443913003578>
99. Faelber K, Gao S, Held M, Posor Y, Haucke V, Noé F, et al. Oligomerization of dynamin superfamily proteins in health and disease [Internet]. 1st ed. Vol. 117, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Copyright © 2013, Elsevier Inc. All Rights Reserved.; 2013. 411–443 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386931-9.00015-5>
100. Michalska B, Duszyński J, Szymański J. [Mechanism of mitochondrial fission - structure and function of Drp1 protein]. *Postepy Biochem* [Internet]. 2016;62(2):127–37. Available from: www.ensembl.org,
101. James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36373–9.
102. Tianzheng Yu, Randall J. Fox LSB and YY. Regulation of mitochondrial fission and apoptosis by the mitochondrial outer membrane protein hFis1. *J Cell Sci* [Internet]. 2005 Sep 15;118(18):4141–51. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.02537>
103. Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2010;191(6):1141–58.
104. Fröhlich C, Grabiger S, Schwefel D, Faelber K, Rosenbaum E, Mears J, et al. Structural insights into oligomerization and mitochondrial remodelling of dynamin 1-like protein. *EMBO J*. 2013;32(9):1280–92.

105. Suen D-F, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* [Internet]. 2008 Jun 15;22(12):1577–90. Available from: <http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e04-04-0294>
106. Parone PA, Martinou JC. Mitochondrial fission and apoptosis: An ongoing trial. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2006;1763(5–6):522–30.
107. Lackner LL, Nunnari JM. The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2009 Dec;1792(12):1138–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443908002457>
108. Lee Y, Jeong S-Y, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2004 Nov;15(11):5001–11. Available from: <http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e04-04-0294>
109. Estaquier J, Arnoult D. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2007;14(6):1086–94.
110. Sekine S, Wang C, Sideris DP, Bunker E, Zhang Z, Youle RJ. Reciprocal Roles of Tom7 and OMA1 during Mitochondrial Import and Activation of PINK1. *Mol Cell* [Internet]. 2019;73(5):1028-1043.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.002>
111. Ding W-X, Yin X-M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem* [Internet]. 2012 Jan 1;393(7):547–64. Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/bchm.2012.393.issue-7/hsz-2012-0119/hsz-2012-0119.xml>
112. Gottlieb RA, Bernstein D. Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming. *Cell Calcium* [Internet]. 2016 Aug;60(2):88–101. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143416016300495>
113. Hamacher-Brady A, Brady NR. Mitophagy programs: Mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(4):775–95.
114. Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, Dawson TM. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci* [Internet]. 2014 Jun;37(6):315–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223614000435>
115. Tanaka A. Parkin-mediated selective mitochondrial autophagy, mitophagy: Parkin

- purges damaged organelles from the vital mitochondrial network. *FEBS Lett* [Internet]. 2010 Apr 2;584(7):1386–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2010.02.060>
116. Halliwell B, Gutteridge JMC. Redox chemistry: the essentials. In: Oxford University Press, editor. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. Oxford, UK; 2015.
 117. DROGE W. *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*. 2002;47–95.
 118. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. 2012;(January):9–19.
 119. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. 2008;4(5):278–86.
 120. Liebert MA, Jones DP. CLINICAL MEASURES OF THE BALANCE. 2006;8.
 121. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*. 1979;59(3):527–605.
 122. Kausar S, Wang F, Cui H. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for. 2018;1–2.
 123. Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Povlishock JT, Rowe GT, et al. Appearance of Superoxide Anion Radical in Cerebral Extracellular Space during Increased Prostaglandin Synthesis in Cats. *Circ Res*. 1985;57:142–51.
 124. Kuppusamy P, Zweiers JL. Characterization of Free Radical Generation by Xanthine Oxidase. 1989;9880–4.
 125. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. The Role of Superoxide Anion. 1999;539–45.
 126. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. 2005;26:340–52.
 127. Fielden BEM, Roberts PB, Bray RC, Lowe DJ, Mautner GN, Molocare B, et al. The Mechanism of Action of Superoxide Dismutase from Pulse Radiolysis and Electron Paramagnetic Resonance. 1974;49–60.
 128. FORMAN HJ, FRIDOVIC I. Super-oxide Dismutase: A Comparison. 1973;(6).
 129. Sawyer T, Valentine S. How Super Is Superoxide? 1981;(21):393–400.
 130. Bielski BHJ, Cabelli DE, Arudi RL, Ross AB. Reactivity of HO₂ / O₂ Radicals in Aqueous Solution. 1985;14(4).
 131. Trujillo M, Ferrer-sueta G, Radi R. Kinetic Studies on Peroxynitrite Reduction by Peroxiredoxins. 2008;441(08):173–96.
 132. Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA. Regulation of the transcription factors NF- κ B and AP-1 by redox changes. 1994;91:91–100.

133. Georgieva E, Ivanova D, Zhelev Z, Bakalova R, Gulubova M, Aoki I. Mitochondrial dysfunction and redox imbalance as a diagnostic marker of “free radical diseases.” *Anticancer Res.* 2017;37(10):5373–81.
134. Allen RG. OXIDATIVE STRESS AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN DEVELOPMENT , AGING AND GENE REGULATION. 1998;21:47–76.
135. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR Del, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants Redox Signal.* 2008;10(8):1343–74.
136. SEN CK, PACKER L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 2018;10((7)):709-20.
137. Sun YI, Oberley LW. REDOX REGULATION OF TRANSCRIPTIONAL ACTIVATORS. 1996;21(3):335–48.
138. Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-Dependent Transcriptional Regulation. 2012;967–74.
139. Mason SA, Morrison D, McConell GK, Wadley GD. Muscle redox signalling pathways in exercise. Role of antioxidants. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2016;98:29–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.022>
140. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(6):1915–28.
141. Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller A, Teixeira M, et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. 2014;
142. Imlays JA, Fridovichs I. Assay of Metabolic Superoxide Production in *Escherichia coli* ". 1991;
143. Chin NF, Freya SQ, B.R. Garry, Rodgers VGJ. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: Mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. *Free Radic Res.* 2007;41(11):1201–11.
144. Sachdev S, Davies KJA. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(2):215–23.
145. Dounce LA, A. DEISSEROTH. Catalase : Physical and Chemical Properties , Mechanism of Catalysis , and Physiological Role. *Physiol Rev.* 1970;50(3).
146. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2010 Aug;1203(1):120–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x>
147. Jones BP, Suggett A. The Catalase-Hydrogen Peroxide System. *Biochem.*

- 1968;110((4)):621–9.
148. Flohe L, Gimzler WA, Eichele E. Glutathione Peroxidase, V - The kinetic mechanism. *Physiol Chem.* 1972;(1971):170–80.
 149. Stone JR. hydrogen peroxide in mammalian systems q. 2004;422:119–24.
 150. Cohen G, Hodistein P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry.* 1991;2:(1420):8.
 151. Morón ÚM, Castilla-cortázar I. Protection Against Oxidative Stress and “ IGF-I Deficiency Conditions .” In: Europe I, editor. *Antioxidant Enzyme.* 2012. p. 90–116.
 152. Pannala VR, Dash RK. Mechanistic characterization of the thioredoxin system in the removal of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* 2015;78(414):42–55.
 153. Cox AG, Peskin A V, Paton LN, Winterbourn CC, Hampton MB. Redox Potential and Peroxide Reactivity of Human Peroxiredoxin 3 †. *Biochemistry.* 2009;48:6495–501.
 154. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem.* 2012;287(7):4403–10.
 155. Winterbourn CC, Peskin A V. Kinetic Approaches to Measuring Peroxiredoxin Reactivity. *Mol Cells.* 2016;39(1):26–30.
 156. Hayes JD, Dinkova-kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci [Internet].* 2014;39(4):199–218. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
 157. Done AJ, Traustadóttir T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biol [Internet].* 2016;10(September):191–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.003>
 158. Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, Von Knethen A. Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):1–19.
 159. Tonelli C, In I, Chio C, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal.* 2018;29(17):1727–45.
 160. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinikova-Kostova AT, et al. Pathways Through Which It Attenuates Degenerative Disease. *Free Radic Biol Med.* 2016;88(0 0):108–46.
 161. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul.* 2006;46(1):113–40.
 162. Kensler TW, Wakabayashi N. Nrf2: Friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis.* 2009;31(1):90–9.

163. Wen Z, Liu W, Li X, Chen W, Liu Z, Wen J. A Protective Role of the NRF2-Keap1 Pathway in Maintaining Intestinal Barrier Function. *Hindawi - Oxidative Med Cell Longev*. 2019;2019.
164. Huang Y, Li W, Su Z, Kong AT. ScienceDirect The complexity of the Nrf2 pathway : beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2015;26(12):1401–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.001>
165. Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2396–402.
166. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 2004;10(11):549–57.
167. Katoh Y, Iida K, Kang M II, Kobayashi A, Mizukami M, Tong KI, et al. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Arch Biochem Biophys*. 2005;433(2):342–50.
168. McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Dimerization of substrate adaptors can facilitate Cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a “tethering” mechanism: A two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem*. 2006;281(34):24756–68.
169. Jain AK, Jaiswal AK. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem*. 2007;282(22):16502–10.
170. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2018;1865(5):721–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>
171. Wu KC, Cui JY, Klaassen CD. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicol Sci*. 2011;123(2):590–600.
172. Kasai S, Mimura J, Ozaki T, Itoh K. Emerging regulatory role of Nrf2 in iron, heme, and hemoglobin metabolism in physiology and disease. *Front Vet Sci*. 2018;5(OCT):1–10.
173. Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang M II, Kobayashi A, Yamamoto M, et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(7):2040–5.
174. Minhaj S, Ahmed U, Luo L, Namani A, Jun X, Tang X. Nrf2 signaling pathway :

- Pivotal roles in inflammation. *BBA - Mol Basis Dis* [Internet]. 2017;1863(2):585–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
175. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7(May):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11624>
 176. Reddy NM, Potteti HR, Mariani TJ, Biswall S, Reddy SP. Conditional deletion of Nrf2 in airway epithelium exacerbates acute lung injury and impairs the resolution of inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(6):1161–8.
 177. Brigelius-Flohé R, Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxidants Redox Signal*. 2011;15(8):2335–81.
 178. Ping Z, Zhang LF, Cui YJ, Chang YM, Jiang CW, Meng ZZ, et al. The Protective Effects of Salidroside from Exhaustive Exercise-Induced Heart Injury by Enhancing the PGC-1 - NRF1/NRF2 Pathway and Mitochondrial Respiratory Function in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015.
 179. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2010;12(3):213–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2021>
 180. Anedda A, López-Bernardo E, Acosta-Iborra B, Saadeh Suleiman M, Landázuri MO, Cadenas S. The transcription factor Nrf2 promotes survival by enhancing the expression of uncoupling protein 3 under conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2013;61:395–407. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.007>
 181. Zhang YKJ, Wu KC, Klaassen CD. Genetic Activation of Nrf2 Protects against Fasting-Induced Oxidative Stress in Livers of Mice. *PLoS One*. 2013;8(3):1–10.
 182. Abdullah A, Kitteringham NR, Jenkins RE, Goldring C, Higgins L, Yamamoto M, et al. Analysis of the role of Nrf2 in the expression of liver proteins in mice using two-dimensional gel-based proteomics. *Pharmacol Reports*. 2012;64(3):680–97.
 183. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462(2):245–53.
 184. Seguin RA, Eldridge G, Lynch W, Paul LC. Strength Training Improves Body Image and Physical Activity Behaviors Among Midlife and Older Rural Women Methods Participants. *J Ext*. 2013;51(4).

185. Elbe AM, Lyhne SN, Madsen EE, Krstrup P. Is regular physical activity a key to mental health? Commentary on “Association between physical exercise and mental health in 1.2 million individuals in the USA between 2011 and 2015: A cross-sectional study” by Chekroud et al., published in *Lancet Psych. J Sport Heal Sci.* 2019;8(1):6–7.
186. Schwartz J, Rhodes R, Bredin S, Oh P, Warburton D. Effectiveness of Approaches to Increase Physical Activity Behavior to Prevent Chronic Disease in Adults: A Brief Commentary. *J Clin Med.* 2019;8(3):295.
187. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep [Internet].* 1902;100(2):126–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3920711>
188. Steele, J., Androulakis-Korakakis, P., Perrin, C., Fisher, J., Gentil, P., Scott, C., & Rosenberger A. The role of modality of exercise as a countermeasure to microgravity induced physical deconditioning: New perspectives and lessons learned from terrestrial studies. *SportRxiv.* 2019;
189. Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2011;43(7):1334–59.
190. Feito Y, Heinrich KM, Butcher SJ, Poston WSC. High-Intensity Functional Training (HIFT): Definition and Research Implications for Improved Fitness. *Sports.* 2018;6(76):1–19.
191. Wasfy MM, Baggish AL. Exercise Dose in Clinical Practice. *Circulation [Internet].* 2016 Jun 7;133(23):2297–313. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.018093>
192. Hoppeler H, Flück M. Plasticity of Skeletal Muscle Mitochondria: Structure and Function. *Med Sci Sport Exerc.* 2003;35(1):95–104.
193. Hoppeler H, Klossner S, Flück M. Gene expression in working skeletal muscle Phenotypic Plasticity of Muscle Structure and. In: Springer, editor. *HYPOXIA AND THE CIRCULATION.* New York; 2007. p. 245–54.
194. Kraemer WJ, Patton JF, Gordon SE, Harman EA, Deschenes MR, Reynolds K, et al. Compatibility of high-intensity strength and endurance training on hormonal and skeletal muscle adaptations. *J Appl Physiol [Internet].* 1995;78(3):976–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7775344>

195. Pescatello LS, MacDonald H V., Lamberti L, Johnson BT. Exercise for Hypertension: A Prescription Update Integrating Existing Recommendations with Emerging Research. *Curr Hypertens Rep.* 2015;17(11).
196. Yan Z, Lira VA, Greene NP. Exercise training-induced Regulation of Mitochondrial Quality. *Exerc Sport Sci Rev [Internet].* 2012 Apr;71(2):1. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003677-900000000-99952>
197. Lopes CR, Aoki MS, Crisp AH, de Mattos RS, Lins MA, da Mota GR, et al. The Effect of Different Resistance Training Load Schemes on Strength and Body Composition in Trained Men. *J Hum Kinet.* 2017;58(1):177–86.
198. William D. McArdle, Frank I. Katch VLK. *Essentials of Exercise Physiology.* 3rd ed. Wolters Kluwer, editor. Philadelphia; 2006.
199. Baker JS, McCormick MC, Robergs RA. Interaction among skeletal muscle metabolic energy systems during intense exercise. *J Nutr Metab.* 2010;2010:1–13.
200. Murray B, Rosenbloom C. Fundamentals of glycogen metabolism for coaches and athletes. *Nutr Rev.* 2018;76(4):243–59.
201. Kolwicz SC. An “Exercise” in Cardiac Metabolism. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5(June).
202. Jung ME, Bourne JE, Little JP. Where does HIT fit? an examination of the affective response to high-intensity intervals in comparison to continuous moderate- And continuous vigorous-intensity exercise in the exercise intensity-affect continuum. *PLoS One.* 2014;9(12):1–18.
203. TABATA, IZUMI; NISHIMURA, KOUJI; KOUZAKI, MOTOKI; HIRAI, YUUSUKE; OGITA, FUTOSHI; MIYACHI, MOTOHIKO; YAMAMOTO K. Effects of moderate-intensity endurance and high-intensity intermittent training on anaerobic capacity and $\dot{V}O_{2\max}$. *Med Sci Sport Exerc.* 1996;28(October 1996):2–9.
204. American College of Sports Medicine. *ACSM’s Guidelines for Exercise Testing and Prescription.* 10rd ed. Wolters Kluwer, editor. Philadelphia; 2017.
205. Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, Macdonald MJ, Mcgee SL, et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J Physiol.* 2008;586(1):151–60.
206. Rakobowchuk M, Tanguay S, Burgomaster KA, Howarth KR, Gibala MJ, MacDonald MJ. Sprint interval and traditional endurance training induce similar improvements in peripheral arterial stiffness and flow-mediated dilation in healthy humans. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2008;295(1):R236–42.

207. Weston KS, Wisløff U, Coombes JS. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: A systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2014;48(16):1227–34.
208. Gibala MJ, McGee SL. Metabolic Adaptations to Short-term High-Intensity Interval Training. *Exerc Sport Sci Rev.* 2008;36(2):58–63.
209. Per-Olof Åstrand , Kaare Rodahl HAD e SBS. Textbook of work physiology: physiological bases of exercise. 4th ed. Human Kinetics., editor. United States; 2003.
210. Jackson MJ. Exercise and oxygen radical production by muscle. In: C.K. Sen, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise* [Internet]. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier B.V.; 2000. p. 57–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-82650-3.50002-X>
211. Boveris BA, Chance B. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. *Biochem J.* 1973;134:707–16.
212. DI MEO & VENDITTI. Mitochondria in Exercise-Induced Oxidative Stress. 2001;125–40.
213. Jenkins, R., & Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(2):210-212.
214. Mason S, Wadley GD. Skeletal muscle reactive oxygen species: A target of good cop/bad cop for exercise and disease. *Redox Rep.* 2014;19(3):97–106.
215. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* [Internet]. 2013;17(2):162–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>
216. Lundby C, Jacobs RA. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. *Exp Physiol.* 2016;101(1):17–22.
217. Perry CGR, Lally J, Holloway GP, Heigenhauser GJF, Bonen A, Spriet LL. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2010;588(23):4795–810.
218. Stephenson EJ, Hawley JA. *Biochimica et Biophysica Acta Mitochondrial function in metabolic health: A genetic and environmental tug of war* ☆. *BBA - Gen Subj* [Internet]. 2013; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.004>
219. Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* [Internet]. 1984;56(4):831–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6373687>
220. Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to

- exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* [Internet]. 1991;71(2):541–85. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1991.71.2.541>
221. Coffey VG, Hawley JA. Molecular basis of training adaptation. *Sport Med*. 2007;37(9):737–63.
 222. Petriz BA, Gomes CPC, Almeida JA, de Oliveira GP, Ribeiro FM, Pereira RW, et al. The Effects of Acute and Chronic Exercise on Skeletal Muscle Proteome. *J Cell Physiol*. 2017;232(2):257–69.
 223. Gibala MJ, Little JP, Macdonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol*. 2012;590(5):1077–84.
 224. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: The central role of PGC-1 α . *Cardiovasc Res*. 2008;79(2):208–17.
 225. Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Brazilian J Med Biol Res*. 2003;36(12):1751–9.
 226. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*. 1993;15(4):353–63.
 227. PAGLIA DE., VALENTINE WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158–69.
 228. Aebi H. [13] Catalase in vitro. In: Colowick S, NO. Kaplan, editors. *METHODS IN ENZYMOLOGY* [Internet]. Florida: Academic Press; 1984. p. 121–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>
 229. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc*. 2012;7(6):1235–46.
 230. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May;72(1–2):248–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>
 231. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
 232. SUTTON JR, JONES NL, TOEWS CJ. Effect of pH on muscle glycolysis during exercise. *Clin Sci*. 1981;61:331–8.

233. Gaitanos GC, Williams C, Boobis LH, Brooks S. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J Appl Physiol*. 1993;75(2):712–9.
234. Ross A, Leveritt M. Long-Term Metabolic and Skeletal Muscle Adaptations to Short-Sprint Trainin...: OneSearch. *Sport Med [Internet]*. 2001;31(15):1063–82. Available from: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=99&sid=9d500806-8f3f-45c3-acd3-f0b9b7bada69%40sessionmgr113&hid=121&bdata=JnNpdGU9ZWRzLWxpdmUmc2NvcGU9c2l0ZQ%3D%3D#db=s3h&AN=5559878>
235. Van Hall G. Lactate kinetics in human tissues at rest and during exercise. *Acta Physiol*. 2010;199(4):499–508.
236. Gastin PB. Energy System Interaction and Relative Contribution During Maximal Exercise. *Sport Med [Internet]*. 2001;31(10):725–41. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00007256-200131100-00003>
237. Bogdanis GC, Nevill ME, Lakomy HKA, Boobis LH. Power output and muscle metabolism during and following recovery from 10 and 20 s of maximal sprint exercise in humans. *Acta Physiol Scand*. 1998;163(3):261–72.
238. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidants Redox Signal*. 2007;9(12):2277–93.
239. Maamoun H, Abdelsalam SS, Zeidan A, Korashy HM, Agouni A. Endoplasmic reticulum stress: A critical molecular driver of endothelial dysfunction and cardiovascular disturbances associated with diabetes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1–21.
240. Ryno LM, Wiseman RL, Kelly JW. Targeting unfolded protein response signaling pathways to ameliorate protein misfolding diseases. *Curr Opin Chem Biol [Internet]*. 2013 Jun;17(3):346–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593113000665>
241. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(2):192–208.
242. Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem*. 2006;387(10–11):1329–35.
243. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1243–76.
244. Anderson EJ, Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2006;290(3).

245. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(10):1208–46.
246. Wang P, Li CG, Qi Z, Cui D, Ding S. Acute exercise stress promotes Ref1/Nrf2 signalling and increases mitochondrial antioxidant activity in skeletal muscle. *Exp Physiol*. 2016;101(3):410–20.
247. Merry TL, Ristow M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. *J Physiol*. 2016;594(18):5195–207.
248. Camera DM, Smiles WJ, Hawley JA. Exercise-induced skeletal muscle signaling pathways and human athletic performance. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2016;98:131–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.007>
249. Dayem AA, Hossain MK, Lee S Bin, Kim K, Saha SK, Yang G, et al. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. 2017;1–21.
250. Hoshino D, Kitaoka Y, Hatta H. High-intensity interval training enhances oxidative capacity and substrate availability in skeletal muscle. *J Phys Fit Sport Med*. 2016;5(1):13–23.
251. Irrcher I, Ljubicic V, Hood DA. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 α transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Physiol*. 2008;296(1):C116–23.
252. Silveira LR, Pilegaard H, Kusuhara K, Curi R, Hellsten Y. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ coactivator 1 α (PGC-1 α), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on rea. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2006;1763(9):969–76.
253. Vargas-Mendoza N, Morales-González Á, Madrigal-Santillán EO, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, García-Melo LF, et al. Antioxidant and Adaptative Response Mediated by Nrf2 during Physical Exercise. *Antioxidants*. 2019;8(6):196.
254. Erlich AT, Tryon LD, Crilly MJ, Memme JM, Moosavi ZSM, Oliveira AN, et al. Function of specialized regulatory proteins and signaling pathways in exercise-induced muscle mitochondrial biogenesis. *Integr Med Res* [Internet]. 2016;5(3):187–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imr.2016.05.003>

255. Niess AM, Simon P. Medical Clinic, Department of Sports Medicine, University of Tuebingen, Germany. *Front Biosci.* 2007;12:4826–38.
256. Campos GER, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: Specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol.* 2002;88(1–2):50–60.
257. Min Chul L, Sung Ki L, Suk Yool J, Hyung Hoon M. New insight of high-intensity interval training on physiological adaptation with brain functions. *J Exerc Nutr Biochem.* 2018;22(3):1–5.
258. Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters LA, et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes.* 2003;52(9):2205–12.
259. Combes A, Dekerle J, Webborn N, Watt P, Bougault V, Daussin FN. Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMKII phosphorylation in human skeletal muscle. *Physiol Rep.* 2015;3(9):1–8.
260. Granata C, Jamnick NA, Bishop DJ. Principles of Exercise Prescription, and How They Influence Exercise-Induced Changes of Transcription Factors and Other Regulators of Mitochondrial Biogenesis. *Sport Med [Internet].* 2018;48(7):1541–59. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0894-4>
261. Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: Activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J.* 2007;21(10):2602–12.
262. Kitaoka Y, Takeda K, Tamura Y, Hatta H. Lactate administration increases mRNA expression of PGC-1 α and UCP3 in mouse skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab [Internet].* 2016 Jun;41(6):695–8. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/apnm-2016-0016>
263. Parolin ML, Chesley A, Matsos MP, Spriet LL, Jones NL, Heigenhauser GJF. Regulation of skeletal muscle glycogen phosphorylase and PDH during maximal intermittent exercise. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1999;277(5 40-5).
264. Brandt N, Dethlefsen MM, Bangsbo J, Pilegaard H. PGC-1 α and exercise intensity dependent adaptations in mouse skeletal muscle. *PLoS One.* 2017;12(10):1–21.
265. Bishop DJ, Granata C, Eynon N. Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content? *Biochim Biophys Acta journa.* 2013;1610(2):155–6.

266. Halling JF, Jessen H, Nøhr-Meldgaard J, Thiellesen Buch B, Masselkhi Christensen N, Gudiksen A, et al. PGC-1 α regulates mitochondrial properties beyond biogenesis with aging and exercise training. *Am J Physiol Metab.* 2019;
267. Vigelsø A, Andersen NB, Dela F. The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* [Internet]. 2014;6(2):84–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057335>
268. Fealy CE, Mulya A, Lai N, Kirwan JP. Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2014;117(3):239–45.
269. Tengan CH, Rodrigues GS, Godinho RO. Nitric oxide in skeletal muscle: Role on mitochondrial biogenesis and function. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):17160–84.
270. Baldelli S, Barbato DL, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR. The role of nNOS and PGC-1 α in skeletal muscle cells. *J Cell Sci.* 2014;127(22):4813–20.
271. Holmström KM, Kostov R V., Dinkova-Kostova AT. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr Opin Toxicol* [Internet]. 2016;2:80–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cotox.2016.10.002>
272. Coleman V, Sa-Nguanmoo P, Koenig J, Schulz TJ, Grune T, Klaus S, et al. Partial involvement of Nrf2 in skeletal muscle mitohormesis as an adaptive response to mitochondrial uncoupling. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–12.
273. Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M, Tarnopolsky MA. Exercise increases mitochondrial PGC-1 α content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem.* 2011;286(12):10605–17.

REFERÊNCIAS

1. Viña J, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello V, Gomez-Cabrera MC. Exercise acts as a drug; The pharmacological benefits of exercise. *Br J Pharmacol.* 2012;167(1):1–12.
2. Fletcher GF, Landolfo C, Niebauer J, Ozemek C, Arena R, Lavie CJ. Reprint of: Promoting Physical Activity and Exercise. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2018;72(23):3053–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109718388570>
3. Singh R. The importance of exercise as a therapeutic agent. *Malays J Med Sci* [Internet]. 2002 Jul;9(2):7–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22844219>

4. Di Meo S, Napolitano G, Venditti P. Mediators of Physical Activity Protection against ROS-Linked Skeletal Muscle Damage. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):1–38.
5. Fahey T, Insel P, Roth T. *Fit & Well: Core Concepts And Labs In Physical Fitness And Wellness*. 13th ed. McGraw Hill, editor. Nova Iorque; 2018.
6. Dunstan DW, Daly RM, Owen N, Jolley D, Vulikh E, Shaw J, et al. Home-based resistance training is not sufficient to maintain improved glycemic control following supervised training in older individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2005;28(1):3–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616225>
7. HASKELL WL, LEE I-M, PATE RR, POWELL KE, BLAIR SN, FRANKLIN BA, et al. Physical Activity and Public Health. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2007 Aug 28;39(8):1423–34. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.185649>
8. Tjønnå AE, Lee SJ, Rognum Ø, Stølen TO, Bye A, Haram PM, et al. Aerobic Interval Training Versus Continuous Moderate Exercise as a Treatment for the Metabolic Syndrome. *Circulation* [Internet]. 2008 Jul 22;118(4):346–54. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.772822>
9. Cockcroft EJ, Williams CA, Tomlinson OW, Vlachopoulos D, Jackman SR, Armstrong N, et al. High intensity interval exercise is an effective alternative to moderate intensity exercise for improving glucose tolerance and insulin sensitivity in adolescent boys. *J Sci Med Sport* [Internet]. 2015;18(6):720–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsams.2014.10.001>
10. Kong Z, Fan X, Sun S, Song L, Shi Q, Nie J. Comparison of high-intensity interval training and moderate-to-vigorous continuous training for cardiometabolic health and exercise enjoyment in obese young women: A randomized controlled trial. *PLoS One*. 2016;11(7):1–16.
11. Cuddy TF, Ramos JS, Dalleck LC. Reduced exertion high-intensity interval training is more effective at improving cardiorespiratory fitness and cardiometabolic health than traditional moderate-intensity continuous training. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(3).
12. Gibala MJ, Little JP, van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, et al. Short-term sprint interval versus traditional endurance training: Similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol*. 2006;575(3):901–11.
13. MacInnis MJ, Gibala MJ. Physiological adaptations to interval training and the role of

- exercise intensity. *J Physiol*. 2017;595(9):2915–30.
14. Weston M, Taylor KL, Batterham AM, Hopkins WG. Effects of Low-Volume High-Intensity Interval Training (HIT) on Fitness in Adults : A Meta-Analysis of Controlled and Non-Controlled Trials. 2014;1005–17.
 15. Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans : Cause and consequences. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2011;51(5):942–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.009>
 16. Wang Y, Nartiss Y, Steipe B, McQuibban GA, Kim PK. ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy*. 2012;8(10):1462–76.
 17. Willems PHGM, Rossignol R, Dieteren CEJ, Murphy MP, Koopman WJH. Redox Homeostasis and Mitochondrial Dynamics. *Cell Metab* [Internet]. 2015;22(2):207–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2015.06.006>
 18. Ogonovszky H, Sasvári M, Dosek A, Berkes I, Kaneko T, Tahara S, et al. The Effects of Moderate , Strenuous , and Overtraining on Oxidative Stress Markers and DNA Repair in Rat Liver. 2005;186–95.
 19. Radak Z, Taylor AW, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress : From muscle to brain. 2001;(October 2014).
 20. Trewin A, Berry B, Wojtovich A. Exercise and Mitochondrial Dynamics: Keeping in Shape with ROS and AMPK. *Antioxidants*. 2018;7(1):7.
 21. Bouchez C, Devin A. Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP / PKA Signaling Pathway. 2019;
 22. Yoo SZ, No MH, Heo JW, Park DH, Kang JH, Kim JH, et al. Effects of acute exercise on mitochondrial function, dynamics, and mitophagy in rat cardiac and skeletal muscles. *Int Neurourol J*. 2019;23(Suppl 1):S22–31.
 23. Chen H, Chan DC. Mitochondrial Dynamics in Mammals. *Curr Top Dev Biol* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2019 May 31];59:119–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0070215304590051?via%3Dihub>
 24. Noguchi M, Kasahara A. Mitochondrial dynamics coordinate cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2018;500(1):59–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.094>
 25. Taylor FJR. Implications and Extensions of the Serial Endosymbiosis Theory of the Origin of Eukaryotes. *Taxon*. 1974;23(2–3):229–58.

26. Andersson SGE, Karlberg O, Canbäck B, Kurland CG, Whatley FR, Van Der Giezen M, et al. On the origin of mitochondria: A genomics perspective. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2003;358(1429):165–79.
27. Lang BF, Gray MW, Burger G. Mitochondrial Genome Evolution and the Origin of Eukaryotes. *Annu Rev Genet* [Internet]. 1999 Dec;33(1):351–97. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genet.33.1.351>
28. Gray MW. Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection. *Nature.* 1998;396(6707):109–10.
29. Gray MW, Doolittle WF. Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol Rev.* 1982;46(1):1–42.
30. Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2012;16(10):1150–80. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2011.4085>
31. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012;13(9):566–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3412>
32. Chen H, Chan DC. Mitochondrial Dynamics in Mammals. *Curr Top Dev Biol.* 2004;59:119–44.
33. Vögtle F-N, Burkhart JM, Rao S, Gerbeth C, Hinrichs J, Martinou J-C, et al. Intermembrane Space Proteome of Yeast Mitochondria. *Mol Cell Proteomics.* 2012;11(12):1840–52.
34. Lee H, Yoon Y. Mitochondrial Fission: Regulation and ER Connection. *Mol Cells.* 2014;37(2):89–94.
35. Fox TD. Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics.* 2012;192(4):1203–34.
36. Ott C, Ross K, Straub S, Thiede B, Gotz M, Goosmann C, et al. Sam50 Functions in Mitochondrial Intermembrane Space Bridging and Biogenesis of Respiratory Complexes. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2012;32(6):1173–88. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.06388-11>
37. Guo R, Zong S, Wu M, Gu J, Yang M. Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell* [Internet]. 2017;170(6):1247-1257.e12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050>
38. Stroud DA, Ryan MT. Mitochondria: Organization of respiratory chain complexes becomes cristae-lized. *Curr Biol* [Internet]. 2013;23(21):R969–71. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.035>
39. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: In sickness and in health. *Cell* [Internet]. 2012;148(6):1145–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035>
 40. Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2012;26(6):711–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>
 41. Wojtczak L, Zabłocki K. Mitochondria w życiu, chorobie i śmierci komórki. *Post Bioch* [Internet]. 2008;54(2):129–41. Available from: http://www.postepybiochemii.pl/pdf/2_2008/01_2_2008.pdf
 42. WILLIAMSON, COOPER. REGULATION OF THE CITRIC ACID CYCLE IN MAMMALIAN SYSTEMS. *FEBS Lett*. 1980;117(August).
 43. Henze K, Martin W. How do mitochondrial genes get into the nucleus? *Trends Genet*. 2001;17(7):383–7.
 44. Wiedemann N, Pfanner N. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annu Rev Biochem*. 2017;86(1):685–714.
 45. Mai N, Chrzanowska-Lightowlers ZMA, Lightowlers RN. The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2017;367(1):5–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-016-2456-0>
 46. Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* [Internet]. 2015;13(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
 47. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* [Internet]. 1981 Apr;290(5806):457–65. Available from: <http://www.nature.com/articles/290457a0>
 48. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*. 2010;47:69–84.
 49. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*. 2018;62(3):341–60.
 50. Kluge MA, Fetterman JL, Vita JA. Mitochondria and Endothelial Function. *Circ Res* [Internet]. 2013 Apr 12;112(8):1171–88. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.111.300233>
 51. Wei H, Liu L, Chen Q. Selective removal of mitochondria via mitophagy: Distinct pathways for different mitochondrial stresses. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*

- [Internet]. 2015;1853(10):2784–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.013>
52. Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. 2007;838–48.
 53. Walker JE. Determination of the structures of respiratory enzyme complexes from mammalian mitochondria. *BBA - Mol Basis Dis*. 1995;1271(1):221–7.
 54. Shokolenko IN, Alexeyev MF. Mitochondrial DNA: A disposable genome? *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2015 Sep;1852(9):1805–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443915001696>
 55. Virbasius J V., Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: A potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(4):1309–13.
 56. Scarpulla RC. Nuclear respiratory factors and the pathways of nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Cardiovasc Med*. 1996;6(2):39–45.
 57. Scarpulla RC. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 2002;1576(1–2):1–14.
 58. Knutti D, Kralli A. PGC-1, a versatile coactivator. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12(8):360–5.
 59. Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, et al. Activation of PPAR γ coactivator-1 through transcription factor docking. *Science* (80-). 1999;286(5443):1368–71.
 60. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. 2005;1(June):361–70.
 61. Puigserver, & Spiegelman BM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator 1 α (PGC- α): Transcriptional Coactivator and Metabolic Regulator. 2003;24(1):78–90.
 62. Michael LF, Wu Z, Cheatham RB, Puigserver P, Adelmant G, Lehman JJ, et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(7):3820–5.
 63. Pilegaard H, Saltin B, Neufer DP. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2003;546(3):851–8.
 64. Akimoto T, Pohnert SC, Li P, Zhang M, Gumbs C, Rosenberg PB, et al. Exercise

- Stimulates Pgc-1 α Transcription in Skeletal Muscle through Activation of the p38 MAPK Pathway *. 2005;280(20):19587–93.
65. Wright DC, Geiger PC, Han DH, Jones TE, Holloszy JO. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 2007;282(26):18793–9.
 66. Popov D V., Lysenko EA, Vepkhvadze TF, Kurochkina NS, Maknovskii PA, Vinogradova OL. Promoter-specific regulation of PPARGC1A gene expression in human skeletal muscle. *J Mol Endocrinol.* 2015;55(2):159–68.
 67. Michel S, Wanet A, De Pauw A, Rommelaere G, Arnould T, Renard P. Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance. *J Cell Physiol.* 2012;227(6):2297–310.
 68. Popov D V., Lysenko EA, Makhnovskii PA, Kurochkina NS, Vinogradova OL. Regulation of PPARGC1A gene expression in trained and untrained human skeletal muscle. *Physiol Rep.* 2017;5(23):1–12.
 69. Pilegaard H, Osada T, Andersen LT, Helge JW, Saltin B, Neufer PD. Substrate availability and transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Metabolism.* 2005;54(8):1048–55.
 70. Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: Redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J.* 2015;282(4):647–72.
 71. ALLEN RG, TRESINI M. OXIDATIVE STRESS AND GENE REGULATION. 2000;28(3):463–99.
 72. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. 2004;(314):357–68.
 73. Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, Wei YH. Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* [Internet]. 2000 Jun 1;348 Pt 2:425–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10816438>
 74. Cannavino J, Brocca L, Sandri M, Grassi B, Bottinelli R, Pellegrino MA. The role of alterations in mitochondrial dynamics and PGC-1 α over-expression in fast muscle atrophy following hindlimb unloading. *J Physiol.* 2015;593(8):1981–95.
 75. Ryan JJ, Marsboom G, Fang YH, Toth PT, Morrow E, Luo N, et al. PGC1 α -mediated mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(8):865–78.

76. Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: The bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2008 Sep;1777(9):1092–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272808001436>
77. Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N, Turnbuu DM. Mammalian mitochondrial genetics: Heredity, heteroplasmy and disease. *Trends Genet.* 1997;13(11):450–5.
78. Twig G, Shirihai OS. The Interplay Between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2010;14(10):1939–51.
79. Brandt T, Cavellini L, Ku W, Biologie L De, Universite S. A mitofusin-dependent docking ring complex triggers mitochondrial fusion in vitro. 2016;1–23.
80. Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K. Two Mitofusin Proteins, Mammalian Homologues of FZO, with Distinct Functions Are Both Required for Mitochondrial Fusion. *J Biochem.* 2003;134(3):333–44.
81. Ferree A, Shirihai O. Mitochondrial Dynamics: The Intersection of Form and Function. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. 2012. p. 13–40. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-3573-0_2
82. Ni HM, Williams JA, Ding WX. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol* [Internet]. 2015;4:6–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2014.11.006>
83. Legros F, Lombès A, Frachon P, Rojo M. Mitochondrial Fusion in Human Cells Is Efficient, Requires the Inner Membrane Potential, and Is Mediated by Mitofusins. Fox TD, editor. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2002 Dec;13(12):4343–54. Available from: <http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e02-06-0330>
84. Chandhok G, Lazarou M, Neumann B. Structure, function, and regulation of mitofusin-2 in health and disease. *Biol Rev.* 2018;93(2):933–49.
85. Escobar-Henriques M. Mitofusins: Ubiquitylation promotes fusion. *Cell Res* [Internet]. 2014;24(4):387–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2014.23>
86. Glauser L, Sonnay S, Stafa K, Moore DJ. Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *J Neurochem.* 2011;118(4):636–45.
87. Liesa M, Bord-d'Água B, Medina-Gómez G, Lelliott CJ, Paz JC, Rojo M, et al. Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1 β . *PLoS One.* 2008;3(10).

88. Zorzano A. Regulation of mitofusin-2 expression in skeletal muscle This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled 14th International Biochemistry of Exercise Conference – Muscles as Molecular and Metabolic Machines, and has under. *Appl Physiol Nutr Metab* [Internet]. 2009;34(3):433–9. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/H09-049>
89. Ansgar Santel, Stephan Frank, Brigitte Gaume, Michael Herrler RJY and, Fuller MT. Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* [Internet]. 2003 Jul 1;116(13):2763–74. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00479>
90. Suárez-Rivero J, Villanueva-Paz M, de la Cruz-Ojeda P, de la Mata M, Cotán D, Oropesa-Ávila M, et al. Mitochondrial Dynamics in Mitochondrial Diseases. *Diseases*. 2016;5(1):1.
91. Cipolat S, de Brito OM, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(45):15927–32.
92. Chan DC. Mitochondrial Fusion and Fission in Mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22(1):79–99.
93. Anand R, Wai T, Baker MJ, Kladt N, Schauss AC, Rugarli E, et al. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol*. 2014;204(6):919–29.
94. Rainbolt TK, Lebeau J, Puchades C, Wiseman RL. Reciprocal Degradation of YME1L and OMA1 Adapts Mitochondrial Proteolytic Activity during Stress. *Cell Rep* [Internet]. 2016 Mar;14(9):2041–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221112471630095X>
95. Sifuentes-Franco S, Pacheco-Moisés FP, Rodríguez-Carrizalez AD, Miranda-Díaz AG. The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. *J Diabetes Res*. 2017;2017(c):1–15.
96. Ježek J, Cooper K, Strich R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants*. 2018;7(1):13.
97. Mears JA, Ramachandran R, Alvarez FJD, Zhou L, Francy CA. The Mechanoenzymatic Core of Dynamin-related Protein 1 Comprises the Minimal Machinery Required for Membrane Constriction. *J Biol Chem*. 2015;290(18):11692–703.
98. Sesaki H, Adachi Y, Kageyama Y, Itoh K, Iijima M. In vivo functions of Drp1:

- Lessons learned from yeast genetics and mouse knockouts. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2014 Aug;1842(8):1179–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443913003578>
99. Faelber K, Gao S, Held M, Posor Y, Haucke V, Noé F, et al. Oligomerization of dynamin superfamily proteins in health and disease [Internet]. 1st ed. Vol. 117, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Copyright © 2013, Elsevier Inc. All Rights Reserved.; 2013. 411–443 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386931-9.00015-5>
 100. Michalska B, Duszyński J, Szymański J. [Mechanism of mitochondrial fission - structure and function of Drp1 protein]. *Postepy Biochem* [Internet]. 2016;62(2):127–37. Available from: www.ensembl.org,
 101. James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem*. 2003;278(38):36373–9.
 102. Tianzheng Yu, Randall J. Fox LSB and YY. Regulation of mitochondrial fission and apoptosis by the mitochondrial outer membrane protein hFis1. *J Cell Sci* [Internet]. 2005 Sep 15;118(18):4141–51. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.02537>
 103. Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2010;191(6):1141–58.
 104. Fröhlich C, Grabiger S, Schwefel D, Faelber K, Rosenbaum E, Mears J, et al. Structural insights into oligomerization and mitochondrial remodelling of dynamin 1-like protein. *EMBO J*. 2013;32(9):1280–92.
 105. Suen D-F, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* [Internet]. 2008 Jun 15;22(12):1577–90. Available from: <http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e04-04-0294>
 106. Parone PA, Martinou JC. Mitochondrial fission and apoptosis: An ongoing trial. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2006;1763(5–6):522–30.
 107. Lackner LL, Nunnari JM. The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2009 Dec;1792(12):1138–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925443908002457>
 108. Lee Y, Jeong S-Y, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis. *Mol*

- Biol Cell [Internet]. 2004 Nov;15(11):5001–11. Available from: <http://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e04-04-0294>
109. Estaquier J, Arnoult D. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2007;14(6):1086–94.
 110. Sekine S, Wang C, Sideris DP, Bunker E, Zhang Z, Youle RJ. Reciprocal Roles of Tom7 and OMA1 during Mitochondrial Import and Activation of PINK1. *Mol Cell* [Internet]. 2019;73(5):1028-1043.e5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.002>
 111. Ding W-X, Yin X-M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem* [Internet]. 2012 Jan 1;393(7):547–64. Available from: <https://www.degruyter.com/view/j/bchm.2012.393.issue-7/hsz-2012-0119/hsz-2012-0119.xml>
 112. Gottlieb RA, Bernstein D. Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming. *Cell Calcium* [Internet]. 2016 Aug;60(2):88–101. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143416016300495>
 113. Hamacher-Brady A, Brady NR. Mitophagy programs: Mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(4):775–95.
 114. Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, Dawson TM. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci* [Internet]. 2014 Jun;37(6):315–24. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223614000435>
 115. Tanaka A. Parkin-mediated selective mitochondrial autophagy, mitophagy: Parkin purges damaged organelles from the vital mitochondrial network. *FEBS Lett* [Internet]. 2010 Apr 2;584(7):1386–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2010.02.060>
 116. Halliwell B, Gutteridge JMC. Redox chemistry: the essentials. In: Oxford University Press, editor. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed. Oxford, UK; 2015.
 117. DROGE W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. 2002;47–95.
 118. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. 2012;(January):9–19.
 119. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. 2008;4(5):278–86.
 120. Liebert MA, Jones DP. CLINICAL MEASURES OF THE BALANCE. 2006;8.

121. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979;59(3):527–605.
122. Kausar S, Wang F, Cui H. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for. 2018;1–2.
123. Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins LW, Povlishock JT, Rowe GT, et al. Appearance of Superoxide Anion Radical in Cerebral Extracellular Space during Increased Prostaglandin Synthesis in Cats. *Circ Res.* 1985;57:142–51.
124. Kuppusamy P, Zweiers JL. Characterization of Free Radical Generation by Xanthine Oxidase. 1989;9880–4.
125. McIntyre M, Bohr DF, Dominiczak AF. The Role of Superoxide Anion. 1999;539–45.
126. Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. 2005;26:340–52.
127. Fielden BEM, Roberts PB, Bray RC, Lowe DJ, Mautner GN, Molocare B, et al. The Mechanism of Action of Superoxide Dismutase from Pulse Radiolysis and Electron Paramagnetic Resonance. 1974;49–60.
128. FORMAN HJ, FRIDOVIC I. Super-oxide Dismutase: A Comparison. 1973;(6).
129. Sawyer T, Valentine S. How Super Is Superoxide? 1981;(21):393–400.
130. Bielski BHJ, Cabelli DE, Arudi RL, Ross AB. Reactivity of HO_2 / O_2 Radicals in Aqueous Solution. 1985;14(4).
131. Trujillo M, Ferrer-sueta G, Radi R. Kinetic Studies on Peroxynitrite Reduction by Peroxiredoxins. 2008;441(08):173–96.
132. Meyer M, Pahl HL, Baeuerle PA. Regulation of the transcription factors NF- κ B and AP-1 by redox changes. 1994;91:91–100.
133. Georgieva E, Ivanova D, Zhelev Z, Bakalova R, Gulubova M, Aoki I. Mitochondrial dysfunction and redox imbalance as a diagnostic marker of “free radical diseases.” *Anticancer Res.* 2017;37(10):5373–81.
134. Allen RG. OXIDATIVE STRESS AND SUPEROXIDE DISMUTASE IN DEVELOPMENT , AGING AND GENE REGULATION. 1998;21:47–76.
135. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Valle NR Del, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants Redox Signal.* 2008;10(8):1343–74.
136. SEN CK, PACKER L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* 2018;10((7)):709-20.
137. Sun YI, Oberley LW. REDOX REGULATION OF TRANSCRIPTIONAL ACTIVATORS. 1996;21(3):335–48.

138. Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-Dependent Transcriptional Regulation. 2012;967–74.
139. Mason SA, Morrison D, McConell GK, Wadley GD. Muscle redox signalling pathways in exercise. Role of antioxidants. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2016;98:29–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.022>
140. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol*. 2018;217(6):1915–28.
141. Sheng Y, Abreu IA, Cabelli DE, Maroney MJ, Miller A, Teixeira M, et al. *Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases*. 2014;
142. Imlays JA, Fridovich I. Assay of Metabolic Superoxide Production in *Escherichia coli* ". 1991;
143. Chin NF, Freya SQ, B.R. Garry, Rodgers VGJ. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: Mathematical insight into in vivo H₂O₂ and GPx concentrations. *Free Radic Res*. 2007;41(11):1201–11.
144. Sachdev S, Davies KJA. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(2):215–23.
145. Dounce LA, A. DEISSEROTH. Catalase: Physical and Chemical Properties, Mechanism of Catalysis, and Physiological Role. *Physiol Rev*. 1970;50(3).
146. Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2010 Aug;1203(1):120–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x>
147. Jones BP, Suggett A. The Catalase-Hydrogen Peroxide System. *Biochem*. 1968;110((4)):621–9.
148. Flohe L, Gimzler WA, Eichele E. Glutathione Peroxidase, V - The kinetic mechanism. *Physiol Chem*. 1972;(1971):170–80.
149. Stone JR. hydrogen peroxide in mammalian systems q. 2004;422:119–24.
150. Cohen G, Hodistein P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry*. 1991;2:(1420):8.
151. Morón ÚM, Castilla-cortázar I. Protection Against Oxidative Stress and “ IGF-I Deficiency Conditions .” In: Europe I, editor. *Antioxidant Enzyme*. 2012. p. 90–116.
152. Pannala VR, Dash RK. Mechanistic characterization of the thioredoxin system in the removal of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*. 2015;78(414):42–55.
153. Cox AG, Peskin A V, Paton LN, Winterbourn CC, Hampton MB. Redox Potential and

- Peroxide Reactivity of Human Peroxiredoxin 3 †. *Biochemistry*. 2009;48:6495–501.
154. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem*. 2012;287(7):4403–10.
 155. Winterbourn CC, Peskin A V. Kinetic Approaches to Measuring Peroxiredoxin Reactivity. *Mol Cells*. 2016;39(1):26–30.
 156. Hayes JD, Dinkova-kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2014;39(4):199–218. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>
 157. Done AJ, Traustadóttir T. Nrf2 mediates redox adaptations to exercise. *Redox Biol* [Internet]. 2016;10(September):191–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.10.003>
 158. Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, Von Knethen A. Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses. *Int J Mol Sci*. 2017;18(12):1–19.
 159. Tonelli C, In I, Chio C, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2018;29(17):1727–45.
 160. Tebay LE, Robertson H, Durant ST, Vitale SR, Penning TM, Dinikova-Kostova AT, et al. Pathways Through Which It Attenuates Degenerative Disease. *Free Radic Biol Med*. 2016;88(0 0):108–46.
 161. Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul*. 2006;46(1):113–40.
 162. Kensler TW, Wakabayashi N. Nrf2: Friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*. 2009;31(1):90–9.
 163. Wen Z, Liu W, Li X, Chen W, Liu Z, Wen J. A Protective Role of the NRF2-Keap1 Pathway in Maintaining Intestinal Barrier Function. *Hindawi - Oxidative Med Cell Longev*. 2019;2019.
 164. Huang Y, Li W, Su Z, Kong AT. ScienceDirect The complexity of the Nrf2 pathway : beyond the antioxidant response. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2015;26(12):1401–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.001>
 165. Stewart D, Killeen E, Naquin R, Alam S, Alam J. Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2396–402.
 166. Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 2004;10(11):549–57.

167. Katoh Y, Iida K, Kang M II, Kobayashi A, Mizukami M, Tong KI, et al. Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome. *Arch Biochem Biophys*. 2005;433(2):342–50.
168. McMahon M, Thomas N, Itoh K, Yamamoto M, Hayes JD. Dimerization of substrate adaptors can facilitate Cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a “tethering” mechanism: A two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. *J Biol Chem*. 2006;281(34):24756–68.
169. Jain AK, Jaiswal AK. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J Biol Chem*. 2007;282(22):16502–10.
170. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2018;1865(5):721–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010>
171. Wu KC, Cui JY, Klaassen CD. Beneficial role of Nrf2 in regulating NADPH generation and consumption. *Toxicol Sci*. 2011;123(2):590–600.
172. Kasai S, Mimura J, Ozaki T, Itoh K. Emerging regulatory role of Nrf2 in iron, heme, and hemoglobin metabolism in physiology and disease. *Front Vet Sci*. 2018;5(OCT):1–10.
173. Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Kang M II, Kobayashi A, Yamamoto M, et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(7):2040–5.
174. Minhaj S, Ahmed U, Luo L, Namani A, Jun X, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *BBA - Mol Basis Dis* [Internet]. 2017;1863(2):585–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.11.005>
175. Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7(May):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11624>
176. Reddy NM, Potteti HR, Mariani TJ, Biswall S, Reddy SP. Conditional deletion of Nrf2 in airway epithelium exacerbates acute lung injury and impairs the resolution of inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(6):1161–8.
177. Brigelius-Flohé R, Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxidants Redox Signal*. 2011;15(8):2335–81.

178. Ping Z, Zhang LF, Cui YJ, Chang YM, Jiang CW, Meng ZZ, et al. The Protective Effects of Salidroside from Exhaustive Exercise-Induced Heart Injury by Enhancing the PGC-1 - NRF1/NRF2 Pathway and Mitochondrial Respiratory Function in Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015.
179. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2010;12(3):213–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2021>
180. Anedda A, López-Bernardo E, Acosta-Iborra B, Saadeh Suleiman M, Landázuri MO, Cadenas S. The transcription factor Nrf2 promotes survival by enhancing the expression of uncoupling protein 3 under conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2013;61:395–407. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.007>
181. Zhang YKJ, Wu KC, Klaassen CD. Genetic Activation of Nrf2 Protects against Fasting-Induced Oxidative Stress in Livers of Mice. *PLoS One*. 2013;8(3):1–10.
182. Abdullah A, Kitteringham NR, Jenkins RE, Goldring C, Higgins L, Yamamoto M, et al. Analysis of the role of Nrf2 in the expression of liver proteins in mice using two-dimensional gel-based proteomics. *Pharmacol Reports*. 2012;64(3):680–97.
183. Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys*. 2007;462(2):245–53.
184. Seguin RA, Eldridge G, Lynch W, Paul LC. Strength Training Improves Body Image and Physical Activity Behaviors Among Midlife and Older Rural Women Methods Participants. *J Ext*. 2013;51(4).
185. Elbe AM, Lyhne SN, Madsen EE, Krstrup P. Is regular physical activity a key to mental health? Commentary on “Association between physical exercise and mental health in 1.2 million individuals in the USA between 2011 and 2015: A cross-sectional study” by Chekroud et al., published in *Lancet Psych*. *J Sport Heal Sci*. 2019;8(1):6–7.
186. Schwartz J, Rhodes R, Bredin S, Oh P, Warburton D. Effectiveness of Approaches to Increase Physical Activity Behavior to Prevent Chronic Disease in Adults: A Brief Commentary. *J Clin Med*. 2019;8(3):295.
187. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* [Internet]. 1992;100(2):126–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3920711>

188. Steele, J., Androulakis-Korakakis, P., Perrin, C., Fisher, J., Gentil, P., Scott, C., & Rosenberger A. The role of modality of exercise as a countermeasure to microgravity induced physical deconditioning: New perspectives and lessons learned from terrestrial studies. *SportRxiv*. 2019;
189. Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM, et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(7):1334–59.
190. Feito Y, Heinrich KM, Butcher SJ, Poston WSC. High-Intensity Functional Training (HIFT): Definition and Research Implications for Improved Fitness. *Sports*. 2018;6(76):1–19.
191. Wasfy MM, Baggish AL. Exercise Dose in Clinical Practice. *Circulation* [Internet]. 2016 Jun 7;133(23):2297–313. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.018093>
192. Hoppeler H, Flück M. Plasticity of Skeletal Muscle Mitochondria: Structure and Function. *Med Sci Sport Exerc*. 2003;35(1):95–104.
193. Hoppeler H, Klossner S, Flück M. Gene expression in working skeletal muscle Phenotypic Plasticity of Muscle Structure and. In: Springer, editor. *HYPOXIA AND THE CIRCULATION*. New York; 2007. p. 245–54.
194. Kraemer WJ, Patton JF, Gordon SE, Harman EA, Deschenes MR, Reynolds K, et al. Compatibility of high-intensity strength and endurance training on hormonal and skeletal muscle adaptations. *J Appl Physiol* [Internet]. 1995;78(3):976–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7775344>
195. Pescatello LS, MacDonald H V., Lamberti L, Johnson BT. Exercise for Hypertension: A Prescription Update Integrating Existing Recommendations with Emerging Research. *Curr Hypertens Rep*. 2015;17(11).
196. Yan Z, Lira VA, Greene NP. Exercise training-induced Regulation of Mitochondrial Quality. *Exerc Sport Sci Rev* [Internet]. 2012 Apr;71(2):1. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00003677-900000000-99952>
197. Lopes CR, Aoki MS, Crisp AH, de Mattos RS, Lins MA, da Mota GR, et al. The Effect of Different Resistance Training Load Schemes on Strength and Body Composition in Trained Men. *J Hum Kinet*. 2017;58(1):177–86.
198. William D. McArdle, Frank I. Katch VLK. *Essentials of Exercise Physiology*. 3rd ed. Wolters Kluwer, editor. Philadelphia; 2006.

199. Baker JS, McCormick MC, Robergs RA. Interaction among skeletal muscle metabolic energy systems during intense exercise. *J Nutr Metab.* 2010;2010:1–13.
200. Murray B, Rosenbloom C. Fundamentals of glycogen metabolism for coaches and athletes. *Nutr Rev.* 2018;76(4):243–59.
201. Kolwicz SC. An “Exercise” in Cardiac Metabolism. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5(June).
202. Jung ME, Bourne JE, Little JP. Where does HIT fit? an examination of the affective response to high-intensity intervals in comparison to continuous moderate- And continuous vigorous-intensity exercise in the exercise intensity-affect continuum. *PLoS One.* 2014;9(12):1–18.
203. TABATA, IZUMI; NISHIMURA, KOUJI; KOUZAKI, MOTOKI; HIRAI, YUUSUKE; OGITA, FUTOSHI; MIYACHI, MOTOHIKO; YAMAMOTO K. Effects of moderate-intensity endurance and high-intensity intermittent training on anaerobic capacity and $\dot{V}O_{2\max}$. *Med Sci Sport Exerc.* 1996;28(October 1996):2–9.
204. American College of Sports Medicine. *ACSM’s Guidelines for Exercise Testing and Prescription.* 10rd ed. Wolters Kluwer, editor. Philadelphia; 2017.
205. Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, Macdonald MJ, Mcgee SL, et al. Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J Physiol.* 2008;586(1):151–60.
206. Rakobowchuk M, Tanguay S, Burgomaster KA, Howarth KR, Gibala MJ, MacDonald MJ. Sprint interval and traditional endurance training induce similar improvements in peripheral arterial stiffness and flow-mediated dilation in healthy humans. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2008;295(1):R236–42.
207. Weston KS, Wisløff U, Coombes JS. High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: A systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med.* 2014;48(16):1227–34.
208. Gibala MJ, McGee SL. Metabolic Adaptations to Short-term High-Intensity Interval Training. *Exerc Sport Sci Rev.* 2008;36(2):58–63.
209. Per-Olof Åstrand , Kaare Rodahl HAD e SBS. *Textbook of work physiology: physiological bases of exercise.* 4th ed. Human Kinetics., editor. United States; 2003.
210. Jackson MJ. Exercise and oxygen radical production by muscle. In: C.K. Sen, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise* [Internet]. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier B.V.; 2000. p. 57–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-82650-3.50002-X>

211. Boveris BA, Chance B. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide. *Biochem J.* 1973;134:707–16.
212. DI MEO & VENDITTI. Mitochondria in Exercise-Induced Oxidative Stress. 2001;125–40.
213. Jenkins, R., & Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging, and exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 1993;25(2):210-212.
214. Mason S, Wadley GD. Skeletal muscle reactive oxygen species: A target of good cop/bad cop for exercise and disease. *Redox Rep.* 2014;19(3):97–106.
215. Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab* [Internet]. 2013;17(2):162–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.12.012>
216. Lundby C, Jacobs RA. Adaptations of skeletal muscle mitochondria to exercise training. *Exp Physiol.* 2016;101(1):17–22.
217. Perry CGR, Lally J, Holloway GP, Heigenhauser GJF, Bonen A, Spriet LL. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2010;588(23):4795–810.
218. Stephenson EJ, Hawley JA. *Biochimica et Biophysica Acta Mitochondrial function in metabolic health: A genetic and environmental tug of war* ☆. *BBA - Gen Subj* [Internet]. 2013; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.12.004>
219. Holloszy JO, Coyle EF. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* [Internet]. 1984;56(4):831–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6373687>
220. Booth FW, Thomason DB. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev* [Internet]. 1991;71(2):541–85. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1991.71.2.541>
221. Coffey VG, Hawley JA. Molecular basis of training adaptation. *Sport Med.* 2007;37(9):737–63.
222. Petriz BA, Gomes CPC, Almeida JA, de Oliveira GP, Ribeiro FM, Pereira RW, et al. The Effects of Acute and Chronic Exercise on Skeletal Muscle Proteome. *J Cell Physiol.* 2017;232(2):257–69.
223. Gibala MJ, Little JP, Macdonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol.* 2012;590(5):1077–84.
224. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial

- biogenesis: The central role of PGC-1 α . *Cardiovasc Res.* 2008;79(2):208–17.
225. Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;36(12):1751–9.
226. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med.* 1993;15(4):353–63.
227. PAGLIA DE., VALENTINE WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158–69.
228. Aebi H. [13] Catalase in vitro. In: Colowick S, NO. Kaplan, editors. *METHODS IN ENZYMOLOGY* [Internet]. Florida: Academic Press; 1984. p. 121–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>
229. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc.* 2012;7(6):1235–46.
230. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May;72(1–2):248–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>
231. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
232. SUTTON JR, JONES NL, TOEWS CJ. Effect of pH on muscle glycolysis during exercise. *Clin Sci.* 1981;61:331–8.
233. Gaitanos GC, Williams C, Boobis LH, Brooks S. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J Appl Physiol.* 1993;75(2):712–9.
234. Ross A, Leveritt M. Long-Term Metabolic and Skeletal Muscle Adaptations to Short-Sprint Trainin...: OneSearch. *Sport Med* [Internet]. 2001;31(15):1063–82. Available from: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=99&sid=9d500806-8f3f-45c3-acd3-f0b9b7bada69%40sessionmgr113&hid=121&bdata=JnNpdGU9ZWRzLWxpdmUmc2NvcGU9c2l0ZQ%3D%3D#db=s3h&AN=5559878>
235. Van Hall G. Lactate kinetics in human tissues at rest and during exercise. *Acta Physiol.* 2010;199(4):499–508.
236. Gastin PB. Energy System Interaction and Relative Contribution During Maximal

- Exercise. *Sport Med* [Internet]. 2001;31(10):725–41. Available from: <http://link.springer.com/10.2165/00007256-200131100-00003>
237. Bogdanis GC, Nevill ME, Lakomy HKA, Boobis LH. Power output and muscle metabolism during and following recovery from 10 and 20 s of maximal sprint exercise in humans. *Acta Physiol Scand*. 1998;163(3):261–72.
238. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidants Redox Signal*. 2007;9(12):2277–93.
239. Maamoun H, Abdelsalam SS, Zeidan A, Korashy HM, Agouni A. Endoplasmic reticulum stress: A critical molecular driver of endothelial dysfunction and cardiovascular disturbances associated with diabetes. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1–21.
240. Ryno LM, Wiseman RL, Kelly JW. Targeting unfolded protein response signaling pathways to ameliorate protein misfolding diseases. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 2013 Jun;17(3):346–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1367593113000665>
241. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(2):192–208.
242. Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem*. 2006;387(10–11):1329–35.
243. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1243–76.
244. Anderson EJ, Neuffer PD. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H₂O₂ generation. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2006;290(3).
245. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(10):1208–46.
246. Wang P, Li CG, Qi Z, Cui D, Ding S. Acute exercise stress promotes Ref1/Nrf2 signalling and increases mitochondrial antioxidant activity in skeletal muscle. *Exp Physiol*. 2016;101(3):410–20.
247. Merry TL, Ristow M. Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. *J Physiol*. 2016;594(18):5195–207.
248. Camera DM, Smiles WJ, Hawley JA. Exercise-induced skeletal muscle signaling pathways and human athletic performance. *Free Radic Biol Med* [Internet].

- 2016;98:131–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.007>
249. Dayem AA, Hossain MK, Lee S Bin, Kim K, Saha SK, Yang G, et al. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. 2017;1–21.
 250. Hoshino D, Kitaoka Y, Hatta H. High-intensity interval training enhances oxidative capacity and substrate availability in skeletal muscle. *J Phys Fit Sport Med.* 2016;5(1):13–23.
 251. Irrcher I, Ljubcic V, Hood DA. Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 α transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Physiol.* 2008;296(1):C116–23.
 252. Silveira LR, Pilegaard H, Kusuhara K, Curi R, Hellsten Y. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ coactivator 1 α (PGC-1 α), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on rea. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2006;1763(9):969–76.
 253. Vargas-Mendoza N, Morales-González Á, Madrigal-Santillán EO, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, García-Melo LF, et al. Antioxidant and Adaptative Response Mediated by Nrf2 during Physical Exercise. *Antioxidants.* 2019;8(6):196.
 254. Erlich AT, Tryon LD, Crilly MJ, Memme JM, Moosavi ZSM, Oliveira AN, et al. Function of specialized regulatory proteins and signaling pathways in exercise-induced muscle mitochondrial biogenesis. *Integr Med Res [Internet].* 2016;5(3):187–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imr.2016.05.003>
 255. Niess AM, Simon P. Medical Clinic, Department of Sports Medicine, University of Tuebingen, Germany. *Front Biosci.* 2007;12:4826–38.
 256. Campos GER, Luecke TJ, Wendeln HK, Toma K, Hagerman FC, Murray TF, et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: Specificity of repetition maximum training zones. *Eur J Appl Physiol.* 2002;88(1–2):50–60.
 257. Min Chul L, Sung Ki L, Suk Yool J, Hyung Hoon M. New insight of high-intensity interval training on physiological adaptation with brain functions. *J Exerc Nutr Biochem.* 2018;22(3):1–5.
 258. Chen ZP, Stephens TJ, Murthy S, Canny BJ, Hargreaves M, Witters LA, et al. Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes.*

- 2003;52(9):2205–12.
259. Combes A, Dekerle J, Webborn N, Watt P, Bougault V, Daussin FN. Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMKII phosphorylation in human skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2015;3(9):1–8.
 260. Granata C, Jamnick NA, Bishop DJ. Principles of Exercise Prescription, and How They Influence Exercise-Induced Changes of Transcription Factors and Other Regulators of Mitochondrial Biogenesis. *Sport Med [Internet]*. 2018;48(7):1541–59. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0894-4>
 261. Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: Activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J*. 2007;21(10):2602–12.
 262. Kitaoka Y, Takeda K, Tamura Y, Hatta H. Lactate administration increases mRNA expression of PGC-1 α and UCP3 in mouse skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab [Internet]*. 2016 Jun;41(6):695–8. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/apnm-2016-0016>
 263. Parolin ML, Chesley A, Matsos MP, Spriet LL, Jones NL, Heigenhauser GJF. Regulation of skeletal muscle glycogen phosphorylase and PDH during maximal intermittent exercise. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 1999;277(5 40-5).
 264. Brandt N, Dethlefsen MM, Bangsbo J, Pilegaard H. PGC-1 α and exercise intensity dependent adaptations in mouse skeletal muscle. *PLoS One*. 2017;12(10):1–21.
 265. Bishop DJ, Granata C, Eynon N. Can we optimise the exercise training prescription to maximise improvements in mitochondria function and content? *Biochim Biophys Acta journa*. 2013;1610(2):155–6.
 266. Halling JF, Jessen H, Nøhr-Meldgaard J, Thiellesen Buch B, Masselkhi Christensen N, Gudiksen A, et al. PGC-1 α regulates mitochondrial properties beyond biogenesis with aging and exercise training. *Am J Physiol Metab*. 2019;
 267. Vigelsø A, Andersen NB, Dela F. The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol [Internet]*. 2014;6(2):84–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057335>
 268. Fealy CE, Mulya A, Lai N, Kirwan JP. Exercise training decreases activation of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein-1 in insulin-resistant human skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2014;117(3):239–45.
 269. Tengan CH, Rodrigues GS, Godinho RO. Nitric oxide in skeletal muscle: Role on

- mitochondrial biogenesis and function. *Int J Mol Sci.* 2012;13(12):17160–84.
270. Baldelli S, Barbato DL, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR. The role of nNOS and PGC-1 α in skeletal muscle cells. *J Cell Sci.* 2014;127(22):4813–20.
271. Holmström KM, Kostov R V., Dinkova-Kostova AT. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr Opin Toxicol* [Internet]. 2016;2:80–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cotox.2016.10.002>
272. Coleman V, Sa-Nguanmoo P, Koenig J, Schulz TJ, Grune T, Klaus S, et al. Partial involvement of Nrf2 in skeletal muscle mitohormesis as an adaptive response to mitochondrial uncoupling. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–12.
273. Safdar A, Little JP, Stokl AJ, Hettinga BP, Akhtar M, Tarnopolsky MA. Exercise increases mitochondrial PGC-1 α content and promotes nuclear-mitochondrial cross-talk to coordinate mitochondrial biogenesis. *J Biol Chem.* 2011;286(12):10605–17.