

ANA FLÁVIA FERNANDES FERREIRA

Efeitos do exercício físico na função e biogênese mitocondrial em modelo da doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2020

ANA FLÁVIA FERNANDES FERREIRA

Efeitos do exercício físico na função e biogênese mitocondrial em modelo da doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto

Versão Corrigida

São Paulo
2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Ferreira, Ana Flávia Fernandes

Efeitos do exercício físico na função e biogênese
mitocondrial em modelo da doença de Parkinson
induzido por 6-hidroxidopamina / Ana Flávia
Fernandes Ferreira; orientador Luiz Roberto
Giorgetti de Britto . -- São Paulo, 2019.

85 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Doença de Parkinson. 2. Exercício físico. 3.
Biogênese mitocondrial. 4. Complexos respiratórios
mitocondriais. 5. Atividade do complexo I. I. ,
Luiz Roberto Giorgetti de Britto, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Flávia Fernandes Ferreira

Título da Dissertação: Efeitos do exercício físico na função e biogênese mitocondrial em modelo da doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Instituto
de Ciências
Biomédicas
Excelência em Ensino e Pesquisa

Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DOENÇA DE PARKINSON: ANÁLISE DA DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL, DA BIOGÊNESE MITOCONDRIAL E DO ESTRESSE OXIDATIVO", protocolada sob o CEUA nº 9196020318, sob a responsabilidade de **Luiz Roberto Giorgetti de Britto e equipe; Ana Flávia Fernandes Ferreira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 08/05/2018.

We certify that the proposal "EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE IN PARKINSON'S DISEASE: ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION, MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND OXIDATIVE STRESS", utilizing 144 Heterogenics rats (144 males), protocol number CEUA 9196020318, under the responsibility of **Luiz Roberto Giorgetti de Britto and team; Ana Flávia Fernandes Ferreira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 05/08/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Fisiologia E Biofísica**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **7 a 9 semanas**

Linhagem: **Wistar**

N amostral: 144

São Paulo, 09 de outubro de 2019

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto, por me receber em seu laboratório, apoiar minha trajetória acadêmica e contribuir para o meu crescimento científico e pessoal.

A Prof^ª. Dra. Luciane Carla Alberici, pela colaboração e grande ajuda nos experimentos de mitocôndria.

Ao técnico Adilson S. Alves, pela imensa ajuda em todos os experimentos, pela companhia e conversas no dia a dia que tornaram esse período mais alegre.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Neurobiologia Celular, Monique Singulani, Carol Parga e Ana Flávia Tostes, pela convivência diária e aprendizado, em especial a Monique, pelo auxílio na execução dos experimentos, discussões científicas, e pela amizade.

Aos meus colegas e amigos do laboratório de Comunicação Neuronal, Paulina Sepulveda e Giovana Bergoc, pelos momentos de confraternização, conversas e risadas.

A Dra Caroline Real, por todo apoio e sugestões que possibilitaram o desenvolvimento desse trabalho, e por todos os ensinamentos científicos como co-orientadora deste projeto.

A minha amiga Karina Binda, companheira desde meu ingresso no mestrado, por me ajudar com os experimentos e discussões, e pela grande amizade que construímos.

A minha família, agradeço pelo incentivo, carinho e apoio em todos os momentos dessa trajetória que só está se iniciando.

Ao Rodolfo, meu amor, amigo e companheiro de vida por me apoiar em todos os momentos dessa caminhada.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPESP por todo apoio financeiro a pesquisa.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho.

AUXÍLIO FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica).

RESUMO

FERREIRA, AFF. **Efeitos do exercício físico na função e biogênese mitocondrial em modelo da doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina**. 2020. 85f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum entre os idosos. É caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNc) e diminuição de dopamina em áreas de projeção, como o estriado (CPu). Estudos recentes têm demonstrado a presença de alterações mitocondriais, tanto em modelos animais quanto em pacientes com DP. As alterações envolvem redução da atividade e da quantidade dos complexos respiratórios e a diminuição dos níveis de fatores transcricionais, como PGC-1 α , NRF-1 e TFAM, responsáveis pela biogênese mitocondrial. Por outro lado, o exercício físico tem se mostrado uma ferramenta importante tanto por atuar na melhora dos sintomas parkinsonianos como por reduzir o risco do desencadeamento da doença. Além disso, diversos estudos em outros modelos apontam seu efeito benéfico ao estimular a biogênese e função mitocondrial. Porém, a relação entre exercício físico e alterações mitocondriais na DP não estão bem estabelecidas, e não se sabe qual a duração necessária de treinamento físico para o surgimento dos efeitos benéficos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do exercício em esteira, em diferentes durações, sobre a expressão de proteínas mitocondriais envolvidas na biogênese (PGC-1 α , NRF-1, TFAM) e na função mitocondrial através da avaliação do sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS). Para tal, ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica com microinfusão de 6-OHDA e ao protocolo de exercício em esteira (40 minutos, 10 m/min, 3x/semana, em dias alternados) por uma ou quatro semanas. Após o término do protocolo de exercício, foram realizados os testes comportamentais (teste de rotação por apomorfina e de marcha). Os níveis de proteínas na SNc e CPu foram mensurados por imuno-histoquímica e *immunoblotting*. A função da atividade dos complexos mitocondriais foi avaliada pelo ensaio da atividade enzimática da cadeia transportadora de elétrons. Os resultados indicaram uma alteração comportamental motora dos ratos injetados com 6-OHDA,

que foi revertida após quatro semanas de treinamento, assim como uma melhora do sistema dopaminérgico. Com relação a mitocôndria, foram encontrados diferenças apenas na SNc. Os benefícios do exercício parecem ocorrer de maneira progressiva ao proteger contra a redução de PGC-1 α e NRF-1 após uma semana de treinamento, e impedir o comprometimento da expressão de PGC-1 α , NRF-1, TFAM e do complexo I, além de sua atividade, após quatro semanas de exercício em esteira. Assim, esse estudo demonstra o provável envolvimento da biogênese e função mitocondrial entre os mecanismos pelo qual o exercício físico intermitente em esteira é capaz de promover uma neuroproteção na DP, mesmo em fases iniciais do treinamento físico.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Exercício físico. Biogênese mitocondrial. Complexos respiratórios mitocondriais. Atividade do complexo I.

ABSTRACT

FERREIRA, AFF. **Effects of physical exercise on mitochondrial biogenesis and function on a Parkinson's disease model induced by 6-hydroxidopamine.** 2020. 85f. Dissertation (Master's degree in Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder among elderly. It is characterized by a progressive loss of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta (SNc) and a decreased of dopamine on its projection areas such as striatum (CPu). Recent studies have shown the presence of mitochondrial alterations, both in animal models and in patients with PD. Alterations involves reduced activity and quantity of respiratory complexes and decreased levels of the transcription factors responsible for mitochondrial biogenesis, such as PGC-1 α , NRF-1 and TFAM. On the other hand, physical exercise has proved to be an important tool as it can improve parkinsonian symptoms and reduce the risk of getting the disease. In addition, several studies point to its beneficial effect of stimulating biogenesis and mitochondrial function. However, the relationship between exercise and mitochondrial alterations in PD is not well established, neither which is the duration of physical exercise capable of promote beneficial effects. In this sense, the objective of this work was to evaluate the effect of different durations of treadmill exercise in the expression of mitochondrial proteins involved in mitochondrial biogenesis (PGC-1 α , NRF-1, TFAM) and function trough the oxidative phosphorylation system (OXPHOS). Male Wistar rats underwent stereotactic surgery with 6-OHDA microinfusion and treadmill exercise protocol (40 minutes, 10 m/min, 3 x/week, one day and another) for one or four weeks. After the end of the protocol, behavioral tests (apomorphine rotation and gait test) were performed. Protein levels in SNc and CPu were measured by immunohistochemistry and immunoblotting. Mitochondrial respiratory function was assessed by the enzymatic activity assay of the electron transport chain. Results indicate a motor behavioral change in rats injected with 6-OHDA that was reversed after four weeks of training, as well as an improvement in the dopaminergic system. Regarding mitochondria, alterations were found only in SNc. Beneficial exercise effects appears to act progressively by protecting against the reduction of PGC-1 α and NRF-1, after one week of training, and preventing an impaired expression of PGC-1 α , NRF-1, TFAM and complex I, and

also its activity, after four weeks of treadmill exercise. Thus, this study demonstrates the possible involvement of mitochondrial biogenesis and function among the mechanisms by which an intermittent physical exercise is capable of promote neuroprotection in PD, even in early phases of physical exercise.

Keywords: Parkinson's disease. Physical exercise. Mitochondrial biogenesis. Mitochondrial respiratory chain. Complex I activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema dos grupos experimentais.	30
Figura 2: Delineamento experimental.....	31
Figura 3: Peso em gramas dos animais submetidos ao protocolo de exercício em esteira por uma semana.....	37
Figura 4: Peso em gramas dos animais submetidos ao protocolo de exercício em esteira por um mês.....	37
Figura 5: Análise da expressão de TH da substância negra pars compacta (SNc) por imuno-histoquímica	39
Figura 6: Análise da expressão de TH no estriado (CPu) por imuno-histoquímica ..	41
Figura 7: Análise da expressão de TH por immunoblotting	42
Figura 8: Análise da expressão de NeuN.....	43
Figura 9: Rotações assimétricas induzidas por apomorfina	44
Figura 10: Análise da marcha dos animais	46
Figura 11: Imagens representativas do teste de marcha	47
Figura 12: Análise da expressão de PGC-1 α da substância negra pars compacta (SNc) por imuno-histoquímica.....	49
Figura 13: Análise da expressão de PGC-1 α do estriado (CPu) por imuno-histoquímica	50
Figura 14: Análise da expressão de NRF-1 da substância negra pars compacta (SNc) por imuno-histoquímica.....	52
Figura 15: Análise da expressão de NRF-1 do estriado (CPu) por imuno-histoquímica	53
Figura 16: Análise da expressão de TFAM da substância negra pars compacta (SNc) por imuno-histoquímica.....	55
Figura 17: Análise da expressão de TFAM do estriado (CPu) por imuno-histoquímica	56
Figura 18: Análise da expressão proteica de PGC-1 α , NRF-1 e TFAM da substância negra por immunoblotting.....	57
Figura 19: Análise da expressão proteica de PGC-1 α , NRF-1 e TFAM do estriado por immunoblotting.....	58
Figura 20: Análise da expressão de OXPHOS da substância negra pars compacta (SNc) por imuno-histoquímica.....	61

Figura 21: Análise da expressão de OXPHOS do estriado (CPu) por imunohistoquímica	62
Figura 22: Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais do hemisfério experimental da substância negra pars compacta (SNc) por immunoblotting	63
Figura 23: Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais do hemisfério controle da substância negra pars compacta (SNc) por immunoblotting.	64
Figura 24: Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais do hemisfério experimental do estriado (CPu) por immunoblotting	65
Figura 25: Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais do hemisfério controle do estriado (CPu) por immunoblotting.....	66
Figura 26: Atividade enzimática do complexo I	67

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Média do peso dos animais	38
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- OH: radical hidroxila
- 6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina
- AICAR: ibonucleotídeo 5-aminoimidazol-4-carboxamida
- ALB: albumina
- AMP: adenosina monofosfato
- AMPK: proteína kinase ativada por AMP
- ANOVA: análise de variância
- AP: anteroposterior
- ATP: adenosina trifosfato
- BDNF: fator neurotrófico derivado do encéfalo
- CaMKIV: proteína kinase dependente de cálcio/calmodulina
- CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
- CI: complexo I
- CII: complexo II
- CIII: complexo III
- CIV: complexo IV
- CV: complexo V
- CONCEA: Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
- CPu: caudado putâmen (estriado)
- CTE: cadeia transportadora de elétrons
- DA: dopamina
- DAB: 3,3'-diaminobenzidina
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DNAmt: ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- DNAnc: ácido desoxirribonucleico nuclear
- DP: doença de Parkinson
- ECL: sistema de detecção de quimiluminescência
- 6-OHDA+EX: animais exercitados que receberam injeção de 6-hidroxi-dopamina
- 6-OHDA+SED: animais sedentários que receberam injeção de 6-hidroxi-dopamina
- EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético
- EGTA: ácido egtálico tetra-acético
- EPM: erro padrão da média

EROs: espécies reativas de oxigênio

EX: animais exercitados que receberam injeção de salina

F: distribuição de *Fisher-Snedecor*

FADH: dinucleótido de flavina e adenina reduzido

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

L-DOPA: levodopa

LL: latero-lateral

MI: medida inicial

MME: membrana mitocondrial externa

MMI: membrana mitocondrial interna

MPTP: 1-metil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina

n: número de amostras

NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado

NADH: dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

NRF-1: fator respiratório nuclear tipo 1

O₂⁻: ânion superóxido

OXPHOS: fosforilação oxidativa

p: nível de significância

PB: tampão fosfato

PFA: paraformaldeído

PGC-1α: co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma

PO: pós-operatório

RNA: ácido ribonucleico

SED: animais sedentários que receberam injeção de salina

SIRT: sirtuína

SNC: substância negra *pars compacta*

SOD: superóxido desmutase

TFAM: fator de transcrição mitocondrial A

TH: tirosina hidroxilase

tRNA: ácido ribonucleico transportador

TTBS: tampão tris salino acrescido de Tween

V: ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Doença de Parkinson.....</i>	18
1.2 <i>Função e Biogênese Mitocondrial.....</i>	20
1.3 <i>Exercício Físico.....</i>	24
1.4 <i>Exercício e mitocôndrias na DP.....</i>	27
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 <i>Gerais.....</i>	29
2.2 <i>Específicos.....</i>	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 <i>Animais.....</i>	30
3.2 <i>Delineamento experimental.....</i>	30
3.3 <i>Indução do Modelo da Doença de Parkinson.....</i>	31
3.4 <i>Protocolo de exercício.....</i>	32
3.5 <i>Acompanhamento do peso corporal dos animais.....</i>	33
3.6 <i>Teste rotacional induzido por apomorfina.....</i>	33
3.7 <i>Teste de marcha.....</i>	33
3.8 <i>Protocolo de imuno-histoquímica.....</i>	34
3.9 <i>Protocolo de immunoblotting.....</i>	35
3.10 <i>Atividade enzimática do complexo I.....</i>	36
3.11 <i>Análise Estatística.....</i>	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 <i>Validação do modelo unilateral de 6-OHDA e efeitos do exercício físico.....</i>	37
5.1.2 <i>Peso corporal.....</i>	37
5.1.3 <i>Tirosina Hidroxilase.....</i>	38
5.1.4 <i>NeuN.....</i>	42
5.1.5 <i>Teste rotacional induzido por apomorfina.....</i>	44

5.1.6 Teste de marcha.....	45
5.2 <i>Biogênese mitocondrial</i>	48
5.2.1 PGC-1 α	48
5.2.2 NRF-1	51
5.2.3 TFAM	54
5.3 <i>Função mitocondrial</i>	59
5.3.1 OXPHOS	59
5.3.2 Atividade enzimática do complexo I.....	66
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS *	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A expectativa de vida da população mundial tem se tornado cada vez maior, acompanhada, conseqüentemente, por um aumento no número de pessoas idosas. Em 2015, 12,3% da população mundial era composta por pessoas com mais de sessenta anos de idade, e essa proporção é estimada para 16,5% em 2030 e para 21,5% em 2050 (UNDESA, 2019). Logo, esse cenário se torna preocupante, visto que o envelhecimento está associado a diversas doenças crônicas e debilitantes, como diabetes, câncer, doenças cardíacas e neurodegenerativas, tal como a doença de Parkinson (FONTANA, 2009; GUSDON *et al.*, 2017).

A DP é uma doença crônica progressiva, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum entre os idosos, logo depois da doença de Alzheimer (PRINGSHEIM *et al.*, 2014). É caracterizada por déficits das funções motoras que levam ao aparecimento de sintomas como bradicinesia (lentidão de movimento ou dificuldade em iniciá-lo), acinesia (ausência de movimento), tremor de repouso, rigidez muscular, instabilidade postural e disfunções na marcha. Há também sintomas não motores, como hiposmia (perda parcial do olfato), mudanças de personalidade, distúrbios de sono, dor muscular e neuropática central, depressão, alucinações, delírio e demência. Os sintomas não motores geralmente surgem antes dos sintomas motores, e são na maioria das vezes negligenciados, o que dificulta o diagnóstico precoce da doença, e conseqüentemente o prognóstico clínico (WHO, 2006).

Com relação à prevalência, a DP afeta entre 1 e 2 indivíduos a cada 1000 habitantes, sendo que o aparecimento da doença antes dos 40 anos de idade se restringe a menos de 5% dos casos. Com a progressão da idade, ocorre um acréscimo no número de casos da doença, acometendo 1% da população em torno de 60 anos e 4% acima de 80 anos (PRINGSHEIM *et al.*, 2014). Causas genéticas envolvem apenas 5-10% dos casos, sendo, portanto, mais comum a forma esporádica da doença (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Estima-se que o custo anual da DP por paciente na cidade de São Paulo seja cerca de dezoito mil reais, o que a torna um fator preocupante para a saúde pública (BOVOLENTA *et al.*, 2017).

A fisiopatologia da DP é caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNc), um dos componentes dos núcleos da base. Neurônios dessa região se projetam para o estriado (núcleos caudado e putâmen) (CPu) pelo trato nigroestriatal, ocorrendo, conseqüentemente, uma redução nos níveis de dopamina nessa estrutura (WHO, 2006; DEXTER; JENNER, 2013). Os núcleos da base participam, principalmente, da circuitaria de controle motor. Entretanto, somente quando cerca de 40-60% dos neurônios dopaminérgicos da substância negra foram degenerados os sintomas motores aparecem e a DP é diagnosticada (GIGUERE; BURKE NANNI; TRUDEAU, 2018).

Estudos que busquem compreender melhor a patogênese e a progressão da DP são fundamentais. Nesse sentido, foram desenvolvidos diversos modelos animais da doença, os quais mimetizam algumas alterações e sintomas observados em humanos. Os modelos com toxina são capazes de induzir a morte dos neurônios dopaminérgicos observada na patologia, e têm sido muito utilizados. Dentre essas toxinas estão o 1-metil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), o paraquat, a rotenona e a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007; GHATAK *et al.*, 2018).

O modelo de indução da DP pela 6-OHDA foi utilizado pela primeira vez em 1968 (UNGERSTEDT, 1968), e desde então tem sido um dos modelos mais empregados para o estudo dessa patologia (SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007). Tendo em vista que a toxina não atravessa a barreira hematoencefálica é necessário administrá-la por meio de uma injeção intracerebral. A neurotoxina é análoga a dopamina e tem afinidade pelo seu transportador, desse modo é levada para o interior de neurônios dopaminérgicos onde é oxidada a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e paraquinona (GHATAK *et al.*, 2018). Após a oxidação, ocorre inibição do complexo respiratório mitocondrial I resultando na produção de radicais livres. Estas reações contribuem para um quadro de estresse oxidativo que, por fim, induz a morte neuronal (KONNOVA; SWANBERG, 2018).

A indução do modelo em roedores geralmente é feita por uma injeção unilateral da toxina no estriado, visto que a bilateral pode aumentar a mortalidade dos animais e quando administrada diretamente na substância negra a morte neuronal é acelerada e severa. Logo, a injeção unilateral no estriado caracteriza um modelo de progressão lenta da neurodegeneração, sendo mais próxima do observado em humanos com a DP, onde há um predomínio na degeneração do

hemisfério cerebral correspondente ao lado contralateral em que se tem início os sintomas clínicos (KONNOVA; SWANBERG, 2018). É importante ressaltar que a 6-OHDA tem seu pico de ação entre o terceiro e o sétimo dia após sua administração, sendo que depois de um mês o processo de morte neuronal já ocorreu, ou seja, a quantidade de neurônios se mantém estável após a ação da 6-OHDA (ALVAREZ-FISCHER *et al.*, 2008; GARCIA; REAL; BRITTO, 2017). Deste modo, com esse modelo podemos avaliar estágios mais precoces da doença, o que se torna útil quando se pretende estudar algum tipo de intervenção terapêutica (HOU *et al.*, 2017).

1.2 Função e Biogênese Mitocondrial

Mitocôndrias são organelas essenciais para a função celular, principalmente por serem capazes de fornecer a energia necessária, por meio da síntese de ATP, para que todos os processos celulares fisiológicos ocorram (VAN DER BLIEK; SEDENSKY; MORGAN, 2017). Além disso, essa organela também exerce outras funções, dentre elas a regulação da homeostase do cálcio, dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de processos apoptóticos (OTERA; MIHARA, 2012; HEKIMI; WANG; NOE, 2016; ROMERO-GARCIA; PRADO-GARCIA, 2019).

A estrutura mitocondrial é composta por um sistema de membranas duplas, uma externa (HOOD *et al.*, 2015) e uma interna (MMI), entre as quais está o espaço intermembranar. Na MMI estão inseridos cinco complexos enzimáticos, dos quais os quatro primeiros (I-IV) fazem parte da cadeia transportadora de elétrons (CTE), e o último deles é responsável pela produção de ATP (Complexo V ou ATP sintase). Dentro da MMI está a matriz mitocondrial, local onde os processos do ciclo de Krebs, também chamado de ciclo do ácido cítrico, ocorrem (TILOKANI *et al.*, 2018).

Pela atividade do ciclo de Krebs elétrons são formados e coenzimas (NADH e FADH) são requeridas para transportá-los até a CTE acoplada ao sistema de fosforilação oxidativa (OXPHOS). Esses elétrons fluem pelos quatro complexos (I-IV) através de uma série de reações de redução e oxidação, sendo o último complexo responsável pela transferência dos elétrons para o aceptor final, uma molécula de oxigênio, formando então água. Nesse processo são bombeados prótons H^+ para o espaço intermembranar, criando um gradiente eletroquímico que é utilizado pela

ATP sintase para fosforilar uma molécula de ADP, resultando na formação de ATP (PROCACCIO *et al.*, 2014; VAN DER BLIEK; SEDENSKY; MORGAN, 2017).

A sequência de eventos que vai desde a oxidação das coenzimas NADH e FADH até a fosforilação do ADP para a síntese do ATP, com a participação dos cinco complexos da enzímicos mitocondriais (I, II, III, IV e V), recebe o nome de respiração celular (WILSON, 2017). Após esse processo, a célula passa a dispor de energia que será utilizada em diversas de suas atividades.

Quando um elétron é transferido para o oxigênio de modo precoce pelos complexos I ou III, ocorre a formação de ânion superóxido (O_2^-). Essa molécula contém um elétron desemparelhado, e por isso se torna instável e tende a interagir com outras moléculas na tentativa de se estabilizar. Para reduzir essa instabilidade a enzima superóxido desmutase (SOD) converte o O_2^- em H_2O_2 . Por sua vez, H_2O_2 também pode ser transformado no radical hidroxila ($\bullet OH$), o qual apresenta maior reatividade (MAILLOUX, 2015). Todas essas moléculas são altamente reativas, e por isso são chamadas de EROs. Quando a produção de EROs excede a capacidade antioxidante da célula um quadro de estresse oxidativo se instala, no qual os EROs podem interagir com proteínas, lipídeos e DNA, causando diversos danos celulares (ANDREYEV *et al.*, 2015).

Diante desse quadro oxidativo, a manutenção da integridade das mitocôndrias se mostra importante. Para tal, novas proteínas precisam ser sintetizadas e esse processo ocorre tanto no núcleo celular quanto na própria organela, que utiliza seu DNA mitocondrial (DNAm) para produzir 13 proteínas, 22 tRNAs e 2 RNAs (DEBALSI; HOFF; COPELAND, 2017). As novas proteínas são integradas às mitocôndrias pré-existentes e, associado ao processo de fissão mitocondrial, resulta na manutenção da densidade e conteúdo mitocondrial e na formação de novas organelas. Esse processo corresponde à biogênese mitocondrial, e é regulado por vários fatores transcricionais (PROCACCIO *et al.*, 2014).

Dentre os fatores transcricionais mencionados, o co-ativador 1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α) é considerado o regulador central da biogênese mitocondrial, por coordenar a transcrição e expressão de importantes proteínas pelo DNA nuclear (DNAn) e mitocondrial (SCARPULLA, 2008). PGC-1 α regula a expressão e a ativação do fator respiratório nuclear 1 (NRF-1), que, por sua vez, atua em genes nucleares que codificam as subunidades da CTE. Juntos, PGC-1 α e NRF-1 ativam a expressão do fator

transcricional mitocondrial (TFAM), que atuará no próprio material genético mitocondrial, levando à síntese de proteínas que compõem as subunidades da cadeia respiratória (HOOD *et al.*, 2015; PALIKARAS *et al.*, 2017).

A atividade de PGC-1 α também pode ser modulada por alguns fatores, dentre eles se destacam a ação de sirtuínas (SIRT) e da proteína quinase ativada por AMP (AMPK). As SIRT, em humanos, compõem uma família de proteínas constituída por sete tipos (SIRT1-7), os quais regulam inúmeros processos, como a expressão gênica, metabolismo celular, apoptose, reparo do DNA, ciclo celular, entre outros (GRABOWSKA; SIKORA; BIELAK-ZMIJEWSKA, 2017). Ademais, também atuam diretamente ativando PGC-1 α ao removerem um grupo acetil da molécula (JODEIRI FARSHBAF *et al.*, 2016). Já o AMPK é uma proteína sensível às alterações nos níveis de AMP/ATP, e assim regula a homeostase energética bem como estimula a ação de PGC-1 α através de sua fosforilação (JODEIRI FARSHBAF *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2016).

Diante de todas essas funções mitocondriais essenciais para a sobrevivência celular, alterações nesta organela podem levar a danos intracelulares que, por conseguinte, desencadeiam modificações teciduais e/ou orgânicas, afetando o funcionamento adequado dos diversos sistemas fisiológicos. Têm sido reportadas alterações mitocondriais em várias patologias, como no glaucoma, na diabetes, no câncer e nas doenças neurodegenerativas (CHATURVEDI; FLINT BEAL, 2013; JODEIRI FARSHBAF *et al.*, 2016). Uma menor produção de ATP, distúrbios na biogênese e mitofagia, alterações na morfologia e na atividade dos complexos respiratórios são exemplos de alterações encontradas (MORTIBOYS *et al.*, 2018).

A associação entre danos mitocondriais e a DP foi primeiramente relatada no estudo de Langston e colaboradores (1983). Neste estudo indivíduos que fizeram uso de droga injetável contaminada com MPTP, um bloqueador do complexo I mitocondrial que é um subproduto da síntese de heroína, apresentaram sintomas característicos de pacientes com DP (LANGSTON *et al.*, 1983). Anos depois, no estudo de Schapira *et al.* (1990), déficits no complexo I mitocondrial foram confirmados em amostras *post-mortem* na substância negra de pacientes diagnosticados com DP (SCHAPIRA *et al.*, 1990).

Desde então, inúmeras pesquisas foram realizadas na tentativa de compreender melhor essa relação, tanto utilizando humanos quanto modelos animais (GRUNEWALD; KUMAR; SUE, 2019). Alterações na biogênese mitocondrial

foram evidenciadas em estudos realizados com a substância negra de humanos *post-mortem*, tais como expressão reduzida de PGC-1 α (ZHENG *et al.*, 2010) e baixos níveis proteicos de TFAM (GRUNEWALD *et al.*, 2016). Ademais, a diminuição no número dos complexos I e II também foi observada (GRUNEWALD *et al.*, 2016). Em modelo animal *knockout* para PGC-1 α foi observada uma maior susceptibilidade de neurônios dopaminérgicos da substância negra ao estresse oxidativo (ST-PIERRE *et al.*, 2006) e à morte celular, além de elevada vulnerabilidade à perda de dopamina no estriado (JIANG *et al.*, 2016). Uma redução da atividade dos complexos I e IV foi observada em ratos submetidos ao modelo de 6-OHDA (KUTER *et al.*, 2016).

Tendo em vista a presença de alterações na função mitocondrial na DP, abordagens que interferem em vias e funções desta organela, tanto por meio da utilização de fármacos ou da manipulação genética, passaram a ser alvo de pesquisas e tem-se mostrado uma linha bastante promissora (MACDONALD *et al.*, 2018). Estudos demonstraram que a superexpressão de PGC-1 α em neurônios dopaminérgicos gerou um efeito neuroprotetor em modelo animal (MUDO *et al.*, 2012) e *in vitro* da DP (ESCHBACH; VON EINEM; MULLER; *et al.*, 2015). Além disso, trabalho realizado com ratos envelhecidos demonstrou que a superexpressão de TFAM aumentou a taxa respiratória mitocondrial e reduziu o estresse oxidativo no tecido cerebral (THOMAS *et al.*, 2012).

Com relação às intervenções farmacológicas, a ativação de PGC-1 α por MitoQ, um suplemento alimentar antioxidante, preveniu morte de neurônios dopaminérgicos em modelo animal com 6-OHDA (XI *et al.*, 2018). O uso de resveratrol, ativador de SIRT1, melhorou sintomas motores e patológicos em modelo MPTP (GUO *et al.*, 2016) e reduziu disfunção mitocondrial e apoptose celular induzida por rotenona em cultura celular (WANG *et al.*, 2018). Por fim, o uso de AICAR, ativador de AMPK, reduziu danos patológicos em modelo *in vitro* (ESCHBACH; VON EINEM; MÜLLER; *et al.*, 2015).

Apesar dos diversos estudos já publicados, a etiologia da DP ainda se mostra bastante complexa, envolvendo diferentes sintomas e modificações fisiológicas e moleculares. Com isso, torna-se difícil o estabelecimento de uma intervenção eficaz capaz de amenizar todas essas manifestações e impedir o avanço da doença (SVEINBJORNSDOTTIR, 2016). Atualmente, o tratamento mais utilizado é com o fármaco levodopa (L-DOPA), molécula precursora da dopamina. Seu uso melhora a

transmissão dopaminérgica no estriado e, desse modo, ameniza os sintomas motores (LEWITT, 2015). Entretanto, efeitos adversos da droga são descritos após seu uso crônico. Dentre eles estão complicações motoras, principalmente as discinesias características (discinesia induzida por L-DOPA) (TRAN *et al.*, 2018) e não-motoras, como distúrbios psiquiátricos, disfunções autonômicas e dor (AQUINO; FOX, 2015). O uso prolongado do fármaco é a principal causa do aparecimento desses sintomas, mas existem outros fatores de predisposição, como a gravidade e duração da doença, a idade do paciente e fatores genéticos (TRAN *et al.*, 2018).

Por conseguinte, diversas pesquisas buscam encontrar terapias alternativas que atuem reduzindo ou retardando os sintomas da DP. Dentre elas, o exercício físico tem sido foco de estudos pela sua capacidade de melhorar a qualidade de vida, o bem estar (KAUSHAL *et al.*, 2019) e a cognição (WANG *et al.*, 2019), de reduzir o risco de quedas (SHERRINGTON *et al.*, 2019) e de prevenir a perda de mobilidade (PERROTIN *et al.*, 2019) em idosos. Ademais, quando nos referimos aos efeitos dessa terapia especificamente na DP, observa-se que indivíduos praticantes de exercício físico apresentaram menor risco de desenvolver a doença (XU *et al.*, 2010) e, ainda, que a prática de treinamento físico resulta em melhora da sintomatologia (KWOK; CHOI; CHAN, 2016).

1.3 Exercício Físico

Na prática clínica, as recomendações para os pacientes diagnosticados com a DP indicam a prática do exercício físico para aqueles que se encontram nas fases iniciais e intermediárias da doença, nas quais os pacientes ainda são capazes de se exercitar. Um dos motivos deve-se ao fato de que os estágios mais tardios da DP requerem uma abordagem mais intensiva a fim de alcançar algum tipo de melhora sintomática para o indivíduo (GALLO; GARBER, 2011; OLIVEIRA DE CARVALHO *et al.*, 2018). Além disso, existem estudos que indicam a impossibilidade de uma proteção ou recuperação do sistema dopaminérgico em estados tardios da DP, pois nessa fase a neurodegeneração se encontra em um estágio muito avançado, com total ou quase ausência de neurotransmissão dopaminérgica, impossibilitando as ações neuroprotetoras do exercício físico (HOU *et al.*, 2017). Nesse sentido, o exercício físico iniciado antes do comprometimento total dos neurônios

dopaminérgicos possibilita ações de mecanismos compensatórios, protetores e até restauradores do sistema dopaminérgico. Ademais, para investigação dos efeitos protetores do exercício o mesmo deve ser iniciado antes ou logo depois da lesão dopaminérgica.

Os efeitos do exercício podem ser representados por uma curva em U invertido, na qual o primeiro ponto representa a inatividade/sedentarismo, fator de risco para várias doenças como obesidade, diabetes, doenças cardíacas e coronárias (MERGHANI; MALHOTRA; SHARMA, 2016), e o último ponto, a extremidade direita da curva, representa o exercício intenso/extenuante, capaz de trazer diversos efeitos negativos. Nesse sentido, um exercício leve-moderado seria o mais adequado, e este seria representado pelo ponto de inflexão da curva (GRADARI *et al.*, 2016). Diversos estudos relatam essa dualidade entre as intensidades do exercício. Um treinamento de baixa-moderada intensidade é capaz de estimular respostas anti-inflamatórias, porém altas intensidades podem resultar em elevados níveis de EROs, gerando um quadro de estresse oxidativo, o qual se torna prejudicial ao cérebro (CAMILETTI-MOIRON *et al.*, 2013). Hormônios estimulados pelo exercício, como os glicocorticoides, também podem estar relacionados a essa dualidade. Exercício leve-moderado resulta em baixos níveis de glicocorticoides que, por sua vez, tem efeitos positivos no hipocampo ao favorecer vias de sobrevivência e suporte neuronal, enquanto que os altos níveis hormonais, induzidos por exercício de alta intensidade, desencadeiam efeitos deletérios no hipocampo (MCEWEN, 2012).

Ainda com relação aos diferentes exercícios várias pesquisas tentam entender qual seria o melhor tipo de treinamento. Muitos estudos relatam benefícios para treinamentos aeróbico, anaeróbicos, de resistência, intervalado, de alta intensidade, entre outros. Porém, para o sistema nervoso central o tipo de exercício aeróbico parece promover mais efeitos positivos. No estudo de Nokia *et al.* (2016), ratos submetidos a três diferentes tipos de treinamento (aeróbico, resistência e intervalado de alta intensidade) mostraram que o exercício aeróbico foi capaz de promover melhores efeitos no cérebro desses animais por estimular a neurogênese do hipocampal (NOKIA *et al.*, 2016).

Por fim, quanto aos tipos de exercício aeróbicos utilizados em pesquisa animal dois são os mais comuns, sendo eles: o forçado e o voluntário. O exercício voluntário geralmente é feito com a instalação de uma roda giratória na gaiola dos

animais, os quais tem livre acesso ao objeto. Nesse tipo de exercício a intensidade e a frequência de atividade são dependentes da vontade do animal (OLIVEIRA; DESLANDES; SANTOS, 2015). Enquanto o exercício forçado, como a esteira ergométrica, a intensidade, duração e frequência do exercício são controladas pelo pesquisador. Assim, o exercício forçado facilita o monitoramento dos animais pelo pesquisador e permite avaliar diferentes protocolos ao alterar duração, inclinação da esteira, velocidade e cronicidade do exercício (ARIDA *et al.*, 2011). Além disso, existem diferenças entre os efeitos dos treinamentos, como exemplo tem-se que o exercício forçado é capaz de induzir uma maior neurogênese do hipocampo do que o exercício voluntário (LEASURE; JONES, 2008).

Após definido o tipo e intensidade do exercício mais apropriados para cada estudo, os pesquisadores buscam entender os mecanismos pelos quais o exercício físico é capaz de promover benefícios, e para o presente trabalho merecem destaque os estudos que relatam efeitos do exercício na DP. Para tal muitas pesquisas utilizam modelos animais, visto a facilidade de manipulação e possibilidade de analisar o que acontece com o sistema nervoso. Estudos em modelos da DP indicam que o exercício físico aumenta a expressão de receptores de dopamina (VUCKOVIC *et al.*, 2010), evita a neurodegeneração por reduzir o estresse oxidativo (DA COSTA *et al.*, 2017), estimula o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), que atua na diferenciação celular, plasticidade sináptica e sobrevivência neuronal, no estriado (HSUEH *et al.*, 2018), e previne o aumento do quadro inflamatório no estriado e na substância negra (REAL; GARCIA; BRITTO, 2017).

Ainda, o exercício físico parece estimular a capacidade oxidativa mitocondrial por atuar na função e morfologia dessa organela (TANAKA *et al.*, 2019). Estudo com ratos envelhecidos submetidos a nado forçado por 12 semanas demonstrou aumento da expressão de PGC-1 α , SIRT e AMPK no músculo (HUANG *et al.*, 2016). Em humanos, elevados níveis de mRNA para PGC-1 α e níveis proteicos de TFAM também foram relatados no músculo de indivíduos submetidos a exercício de alta intensidade (FIORENZA *et al.*, 2018). O aumento da expressão proteica de SIRT1 e PGC-1 α , da atividade de AMPK e do complexo IV, e a elevação dos genes que codificam NRF-1, TFAM, complexos I-V foi observada no músculo de camundongos exercitados (LIU; CHANG, 2018).

As alterações foram encontradas não somente no tecido muscular, mas também no cérebro de diversos modelos animais. Animais submetidos a treinamento por oito semanas apresentaram um aumento da expressão proteica de PGC-1 α (E; BURNS; SWERDLOW, 2014), e da expressão gênica de PGC-1 α e SIRT1 (STEINER *et al.*, 2011). Um treinamento mais curto, de três semanas, também demonstrou aumento da atividade do complexo I e da taxa respiratória mitocondrial em diversas regiões cerebrais de ratos idosos (GUSDON *et al.*, 2017).

1.4 Exercício e mitocôndrias na DP

Com relação à DP são poucos os estudos que investigaram a atuação do exercício nas mitocôndrias. Algumas pesquisas mencionam os benefícios do treinamento em esteira na manutenção da expressão de proteínas transportadoras mitocondriais (KOO; CHO; LEE, 2017), restauração da taxa de respiração mitocondrial e dos níveis de ATP (LAU *et al.*, 2011), restauração dos níveis de TFAM e NRF-1 e da expressão dos complexos II e V (JANG *et al.*, 2018) no modelo MPTP, recuperação dos níveis proteicos dos complexos I-IV (CHUANG *et al.*, 2017) e aumento dos níveis de SIRT1 (TUON *et al.*, 2015) no modelo 6-OHDA. Entretanto, a maioria desses trabalhos fizeram uso de treinamentos intensos (velocidades: ex. 12 e 15m/min) (LAU *et al.*, 2011; CHUANG *et al.*, 2017; JANG *et al.*, 2018), prolongados (duração: ex. 50 e 60 minutos) (TUON *et al.*, 2015; KOO; CHO; LEE, 2017; JANG *et al.*, 2018), contínuos (treinamentos todos os dias e até duas vezes ao dia) e duradouros (ex. 6, 8, 12 e 18 semanas) (LAU *et al.*, 2011; TUON *et al.*, 2015; KOO; CHO; LEE, 2017; JANG *et al.*, 2018). Nesse sentido faltam estudos que avaliem protocolos de exercício intermitente de intensidade leve a moderada, o que estaria mais próximo da população, especialmente daqueles indivíduos de idade mais avançada.

Sob este aspecto, são indispensáveis estudos para melhor compreensão da relação entre exercício físico e a função e biogênese mitocondrial na DP, facilitando o direcionamento de novos alvos farmacológicos, o que possibilita o desenvolvimento de novos tratamentos e terapias, além de estratégias de prevenção, diagnóstico e monitoramento da doença. Ademais, é importante também identificar quais as durações de protocolo resultam em benefícios, auxiliando no estabelecimento de guias práticos para a população. Vale salientar que é

fundamental a identificação de efeitos positivos em treinamentos de menor duração e intensidade, uma vez que se tornam mais realísticos com o cotidiano do paciente, o que acaba por encorajá-los à prática (KAUSHAL *et al.*, 2019).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado os mecanismos envolvidos na DP e os efeitos do exercício físico nessa patologia. Resultados anteriores confirmaram os benefícios do treinamento em esteira no modelo animal com a neurotoxina 6-OHDA (REAL *et al.*, 2013; GARCIA; REAL; BRITTO, 2017; REAL; GARCIA; BRITTO, 2017; BINDA *et al.*, 2019). Assim, esse trabalho busca contribuir com o conhecimento até então adquirido ao investigar os possíveis efeitos protetores do exercício em esteira, em duas diferentes durações de protocolo, no modelo animal unilateral da DP induzido por 6-OHDA e, também, avaliar se esses efeitos podem estar relacionados com a melhora da função e biogênese mitocondrial.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Compreender os efeitos do exercício físico em esteira, em diferentes durações de protocolo, sobre a função e biogênese mitocondrial no modelo da DP induzido pela injeção unilateral de 6-OHDA.

2.2 Específicos

- Validar o modelo animal da DP, induzido pela injeção de 6-OHDA, por meio do comportamento rotacional induzido por apomorfina e por imunomarcação para tirosina-hidroxilase pela técnica de imuno-histoquímica e *immunoblotting*;
- Analisar o comportamento motor dos animais por meio do teste de marcha;
- Analisar a imunomarcação para núcleo neuronal (NeuN) na substância negra;
- Analisar a imunomarcação dos fatores de transcrição responsáveis pela biogênese (PGC-1 α , NRF-1 e TFAM) e função (OXPHOS) mitocondrial por meio da técnica de imuno-histoquímica;
- Analisar a expressão proteica dos fatores de transcrição responsáveis pela biogênese (PGC-1 α , NRF-1 e TFAM) e função (OXPHOS – CI-CV) mitocondrial por meio da técnica de *immunoblotting*;
- Analisar a função mitocondrial por meio da atividade enzimática da CTE mitocondrial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

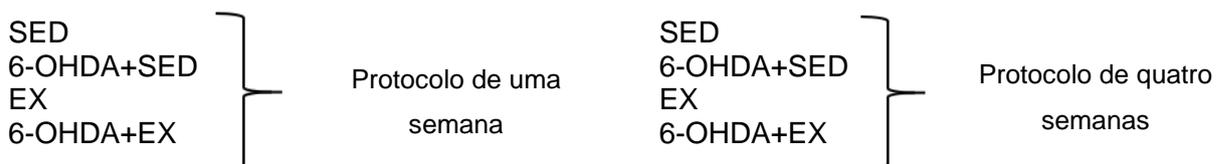
3.1 Animais

Para esse estudo foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 250 e 300 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram acondicionados em ambiente controlado com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade do ar $55 \pm 10\%$ e ciclo de luz claro-escuro invertido artificialmente (12h/12h; 0-12h: claro, 12h-0h: escuro), com livre acesso à ração padrão (Presence® Ratos e Camundongos; Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*. Este estudo foi conduzido de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CEUA-ICB/USP), protocolo nº 9196020318.

3.2 Delineamento experimental

Os ratos foram divididos ($n=5-6/\text{grupo}$), de forma randomizada, nos seguintes grupos experimentais: animais sedentários com injeção de salina (SED), animais sedentários com injeção de 6-OHDA (6-OHDA+SED), animais exercitados com injeção de salina (EX) e animais exercitados com injeção de 6-OHDA (6-OHDA+EX), como demonstrado na ilustração abaixo:

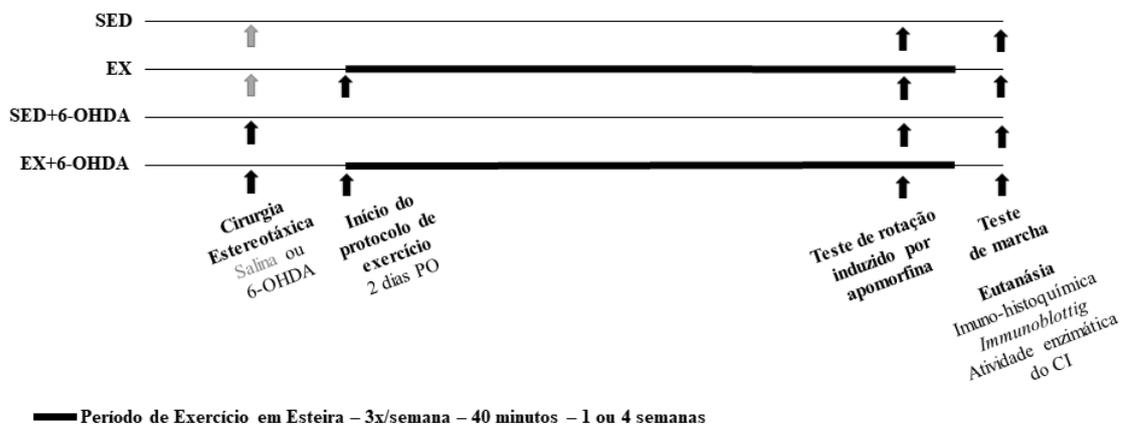
Figura 1: Esquema dos grupos experimentais.



Inicialmente os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica com administração da neurotoxina 6-OHDA ou solução salina, de acordo com o grupo.

Dois dias após o procedimento cirúrgico, foi iniciado o protocolo de exercício em esteira por um período de uma ou quatro semanas. O comportamento rotacional induzido por apomorfina foi realizado dois dias antes da eutanásia. Já, o teste de marcha foi realizado um dia após a última sessão de corrida. Os animais foram eutanasiados, um dia após a última sessão de treinamento em esteira, e os encéfalos foram coletados e submetidos ao ensaio de imuno-histoquímica, *immunoblotting* e atividade enzimática do Complexo I (Figura 2).

Figura 2: Delineamento experimental.



PO: pós-operatório; CI: complexo I.

3.3 Indução do Modelo da Doença de Parkinson

O modelo animal da DP foi induzido por injeção da toxina análoga a dopamina, a 6-OHDA (H4381, Sigma), a qual atua seletivamente em células catecolaminérgicas levando a excitotoxicidade celular, e então a produção de radicais livres que causam lesões nos neurônios dopaminérgicos da substância negra, promovendo a perda neuronal observada na DP (HERNANDEZ-BALTAZAR; ZAVALA-FLORES; VILLANUEVA-OLIVO, 2017).

Para tal, os animais foram anestesiados com uma mistura de isoflurano e oxigênio (5% para indução e 2% para manutenção - 0,8 L/min). A 6-OHDA foi microinfundida estereotaxicamente no CPu direito (lesão unilateral), promovendo uma lesão retrógrada dos neurônios dopaminérgicos nigro-estriatais. As injeções foram realizadas em 2 duas coordenadas: anteroposterior (AP) +0,5; laterolateral

(LL) -2,7; ventral (V) - 4,5 mm e AP - 0,5; L -3,2; V -5 mm; relativos ao bregma (PAXINOS; FRANKLIN, 2019) sendo que em cada ponto foi injetado lentamente 1,5 µl da droga contendo 9 µg da neurotoxina (6-OHDA diluída em salina e 0,3% de ácido ascórbico). Os dois pontos de injeção têm por objetivo garantir que as áreas rostro-caudais, medio-laterais e ventro-dorsais do CPu fossem atingidas pela toxina, totalizando uma concentração de 18 µg de 6-OHDA. Após a cirurgia foi administrado um medicamento para analgesia (ketoprofeno - 1 mg/kg, s.c) (BINDA *et al.*, 2019). Os animais foram monitorados diariamente para a avaliação do estado geral do animal e certificação da melhora pós-operatória.

3.4 Protocolo de exercício

Os animais foram submetidos ao treinamento aeróbico de intensidade leve/moderada (60-70% do VO₂ máximo) (FELIX; MICHELINI, 2007; LEANDRO *et al.*, 2007) durante seu período ativo, ou seja, ciclo escuro, em uma esteira ergométrica programável (KT 3000 - IMBRAMED) adaptada para ratos. Os animais foram submetidos a um período de habituação dois dias antes do procedimento de estereotaxia, no qual foram colocados na esteira por 15 min, com velocidade inicial de 6,7 m/min com acréscimos de 1,7 m/min a cada minuto até atingir a velocidade de 10 m/min, a qual foi mantida até completar os 15 min.

Dois dias após a cirurgia, os animais foram submetidos ao protocolo de exercício que consistiu em um treino de 40 min a uma velocidade de 10 m/min realizado três vezes por semana, em dias intercalados, durante uma (3 sessões) ou quatro semanas (12 sessões), de acordo com o grupo experimental (REAL *et al.*, 2013; REAL; GARCIA; BRITTO, 2017).

Os animais foram sacrificados 24 horas após o término da última sessão de treinamento com o intuito de evitar interferência de efeitos agudos do exercício. Esse período é suficiente para restaurar os níveis de lactato, sendo considerado uma variável muito utilizada como indicador de recuperação do exercício (MENZIES *et al.*, 2010; VAN HOOREN; PEAKE, 2018). Além disso, a ativação de PGC-1 α induzida pelo exercício agudo é transitória, sendo que no período de 24 horas após o término do treinamento esse coativador retorna a suas expressões basais (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003).

3.5 Acompanhamento do peso corporal dos animais

Os animais foram pesados um dia antes da cirurgia estereotáxica e acompanhados ao longo de todo procedimento experimental, com medidas de peso realizadas ao fim de cada semana de treinamento. Desse modo, duas medidas (animais treinados por uma semana) e cinco medidas (animais treinados por um mês) foram obtidas. Com isso, foi possível acompanhar o crescimento dos animais e avaliar possíveis interferências decorrentes do protocolo experimental.

3.6 Teste rotacional induzido por apomorfina

Dois dias antes da eutanásia os animais (n=6/grupo) foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina para avaliar o grau da lesão induzida pela 6-OHDA. A apomorfina é um agonista dos receptores de dopamina, assim quando administrada em animais lesionados unilateralmente provoca uma rotação assimétrica em direção ao lado contralateral a lesão, nesse modelo os animais rodam em direção ao lado esquerdo do hemisfério corporal, visto que administramos a 6-OHDA no lado direito do hemisfério cerebral. Para isso, 0,5 mg/kg de apomorfina (s.c., A4393, Sigma) foram administrados nos animais. O número de rotações foi contado por um rotâmetro automático (Rota-Count 8, Columbus Instruments) durante 30 minutos após a injeção (REAL *et al.*, 2013).

3.7 Teste de marcha

O teste de marcha foi realizado para avaliar a locomoção dos animais (n=6/grupo). Para tal, as patas dianteiras e traseiras dos animais foram coradas utilizando pigmentos de cores diferentes, e em seguida, colocados nas raias da esteira, as quais foram cobertas com papel branco, para que se locomovessem em linha reta. As marcas do início e do fim da caminhada foram excluídas, sendo consideradas para análise apenas as pegadas nítidas. Quatro impressões deixadas pelas patas de cada animal foram analisadas. No total foram consideradas seis medidas, sendo quatro delas para comprimento das passadas (comprimento entre pegadas da pata posterior direita, posterior esquerda, anterior direita e anterior esquerda) e duas para largura da passada (distância entre as patas anteriores e

distância entre as patas posteriores) (MEI *et al.*, 2016; ROSTOSKY; MILOSEVIC, 2018).

3.8 Protocolo de imuno-histoquímica

Os animais (n=5-6/grupo) foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (25 mg/kg) via intraperitoneal e submetidos à perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% (NaCl), seguida de solução de paraformaldeído 4% (PFA) dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e armazenados em PFA por 4h. Depois desse período, o material foi transferido para uma solução de sacarose a 30% em PB 0,1 M. Após 48h, os tecidos foram cortados em uma espessura de 30 µm em micrótomo deslizante de congelamento (LEICA SM 2000R) e mantidos em PB 0,1 M a 4°C até o momento do procedimento da imuno-histoquímica.

Os cortes obtidos contendo as regiões CPu e SNc foram incubados com os anticorpos primários para tirosina hidroxilase (TH) (MAB5280, Chemicon - 1:5000), núcleo neuronal (NeuN) (MAB377, Chemicon -1:500), PGC-1α (ab54481, Abcam - 1:500), NRF-1 (sc-28379, Santa Cruz - 1:1000), TFAM (ab131607, Abcam - 1:1000) e OXPHOS (ab110413, Abcam - 1:1000) por um período de 14-18 h em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados com PB 0,1 M três vezes e incubados com anticorpo secundário biotilado por 2h. Após esse período os cortes foram novamente lavados com PB 0,1 M e incubados com complexo avidina-biotina-peroxidase (kit ABC ELITE) por 2h. Por fim, a revelação foi realizada com 3-3'-diaminobenzina (DAB). Os cortes foram colocados em lâminas para posterior desidratação.

As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico (Microscópio – Nikon Eclipse E1000, Câmera de Captura – Nikon DXM1200) e imagens das regiões de interesse (três cortes de cada animal) foram capturadas e analisadas no programa ImageJ (NIH, USA). As marcações com TH, PGC-1α, NRF-1, TFAM e NeuN na SNc foram analisadas pela contagem manual de número de células marcadas; PGC-1α, NRF-1 e TFAM no CPu foram analisadas pela contagem de células marcadas utilizando o *particle plugin* do ImageJ; TH no CPu e OXPHOS no CPu e SNc foram analisadas pela densidade óptica relativa. Os hemisférios experimentais (direito) e controle (esquerdo) foram analisados separadamente.

3.9 Protocolo de immunoblotting

Os animais foram eutanasiados (n=5-6/grupo) e as regiões do mesencéfalo e CPu foram coletadas e homogeneizadas a 4 °C em tampão de lise RIPA (NaCl 2 M; Tris 1 M, pH 7,4; EDTA 0,5 M; Triton X-100 a 10% (v/v); deoxicolato de sódio a 10% (w/v); SDS a 10% (w/v); ditiotretitol 1 M) e solução de inibidores de proteases. O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm e a concentração proteica do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria, utilizando reagente para ensaio de proteína (BRADFORD, 1976). Em seguida foi adicionado o tampão anti-desnaturante Laemmli (Tris/HCl 125 mM, pH 6,8; SDS a 2,5% (p/v), β -mercaptoetanol a 2,5%; EDTA 4mM e azul de bromofenol a 0,05%) e as amostras foram incubadas a 50 °C por 5 min.

As amostras foram submetidas à eletroforese em géis de acrilamida de 8 e 12% e eletro-transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em sistema de transferência (Trans-Blotcell system; Bio-Rad). Após a transferência, as membranas foram incubadas com solução de bloqueio constituída de albumina (ALB) a 5% em tampão contendo TTBS (24 g de Tris-HCl 0,01 M, pH 7,4; 88 g de NaCl 0,15 M, Tween 20 a 0,05%; água destilada q.s.p. 1L) por 2h à temperatura ambiente e sob leve agitação. As membranas foram lavadas por 3 vezes de 10 min com solução TTBS e incubadas com os anticorpos primários: TH (MAB5280, Chemicon - 1:5000), PGC-1 α (ab54481, Abcam - 1:500), NRF-1 (sc-28379, Santa Cruz - 1:1000), TFAM (ab131607, Abcam - 1:1000), OXPHOS (ab110413, Abcam - 1:1000), β -actina (42 kDa; A5316, SIGMA-ALDRICH - 1:5000) e VDAC2 (30-32 kDa; ab37985, Abcam - 1:1000) em solução de bloqueio contendo ALB a 3%, *overnight* a 4 °C, sob leve agitação. Depois, as membranas foram lavadas com solução TTBS e incubadas por 2h com anticorpo secundário conjugado com peroxidase em solução de bloqueio de ALB a 1%. Para a revelação foi utilizado o kit quimioluminescente (ECL, Bio-Rad) e as bandas foram capturadas pelo equipamento C-Digit® Blot Scanner (LI-COR®; Lincoln, NE, EUA) e analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade usando o programa ImageStudio™Digits Versão 3.1 (LI-COR®). Os dados obtidos foram corrigidos pela densidade óptica da marcação para o anticorpo primário β -actina (TH, PGC1- α , NRF-1,TFAM e VDAC2) e VDAC2 (OXPHOS).

3.10 Atividade enzimática do complexo I

A atividade enzimática do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial é um ensaio utilizado para acessar a máxima atividade catalítica dos complexos mitocondriais, permitindo avaliar possíveis disfunções dessa organela. Foi realizada apenas a atividade do complexo I, tendo em vista os resultados obtidos pela análise de *immunoblotting*. Para tal animais (n=6/grupo) foram eutanasiados e seus mesencéfalos foram coletados e posteriormente homogeneizados. Seguindo o procedimento descrito por Spinazzi et al. (2012), as reações foram ajustadas para microplacas de 96 poços. A atividade do complexo I foi medida pela oxidação de NADH a 340 nm. Os dados foram expressos como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas totais (SPINAZZI *et al.*, 2012).

3.11 Análise Estatística

Os dados foram normalizados pelo grupo controle (SED submetido ao protocolo de uma semana) e as análises realizadas utilizando o software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 23 para Windows (IBM® SPSS® Statistic, Chicago, IL). O teste Three-way ANOVA foi realizado para avaliar as diferenças entre os grupos, considerando como variáveis os fatores injeção, exercício e duração do treinamento, seguido do pós-teste de múltiplas comparações de Bonferroni. O valor de $p \leq 0,05$ foi adotado como nível de significância. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) em gráficos construídos no software GraphPad Prisma6®.

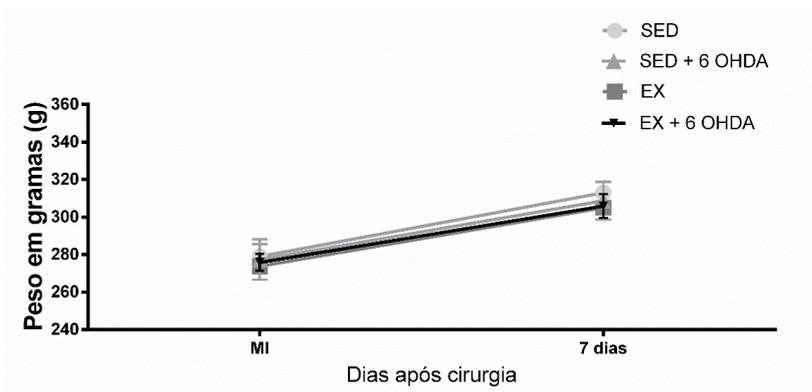
5 RESULTADOS

5.1 Validação do modelo unilateral de 6-OHDA e efeitos do exercício físico

5.1.2 Peso corporal

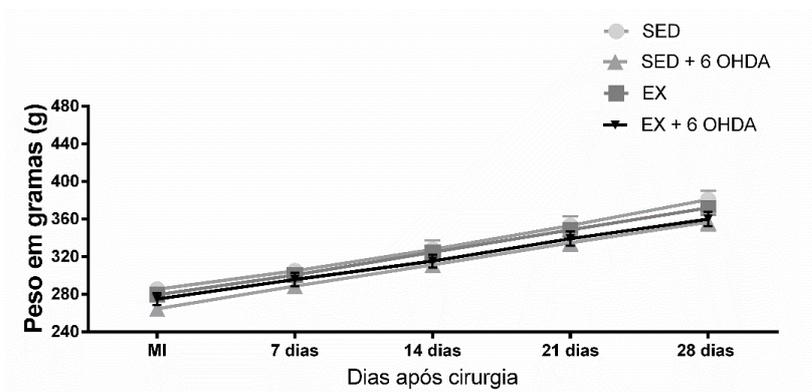
Na análise do peso corporal dos animais não houve diferença entre os grupos [treinamento 1 semana: $F(3, 42)=0,231$; $p=0,874$; treinamento 1 mês: $F(12, 168)=0,695$; $p=0,755$] nos dois protocolos de treinamento (Figura 3, Figura 4). Foi observada uma diferença apenas quando avaliamos o peso ao longo das semanas em todos os grupos, com aumento do peso ($p<0,001$). A média \pm desvio padrão dos pesos dos animais estão descritos na tabela 1 abaixo.

Figura 3: Peso em gramas dos animais submetidos ao protocolo de exercício em esteira por uma semana



MI = medida inicial.

Figura 4: Peso em gramas dos animais submetidos ao protocolo de exercício em esteira por um mês



MI=medida inicial.

Tabela 1: Média do peso dos animais

1 Semana					4 Semanas				
	SED	EX	6-OHDA+SED	6-OHDA+EX		SED	EX	6-OHDA+SED	6-OHDA+EX
MI	279±21	274±32	277±37	276±16	MI	286±26	280±19	265±17	275±22
7 dias	313±18	305±31	309±35	306±22	7 dias	305±25	301±27	289±26	296±25
					14 dias	328±29	325±32	312±28	315±35
					21 dias	353±30	349±34	335±31	339±26
					28 dias	381±30	372±35	375±33	360±27

5.1.3 Tirosina Hidroxilase

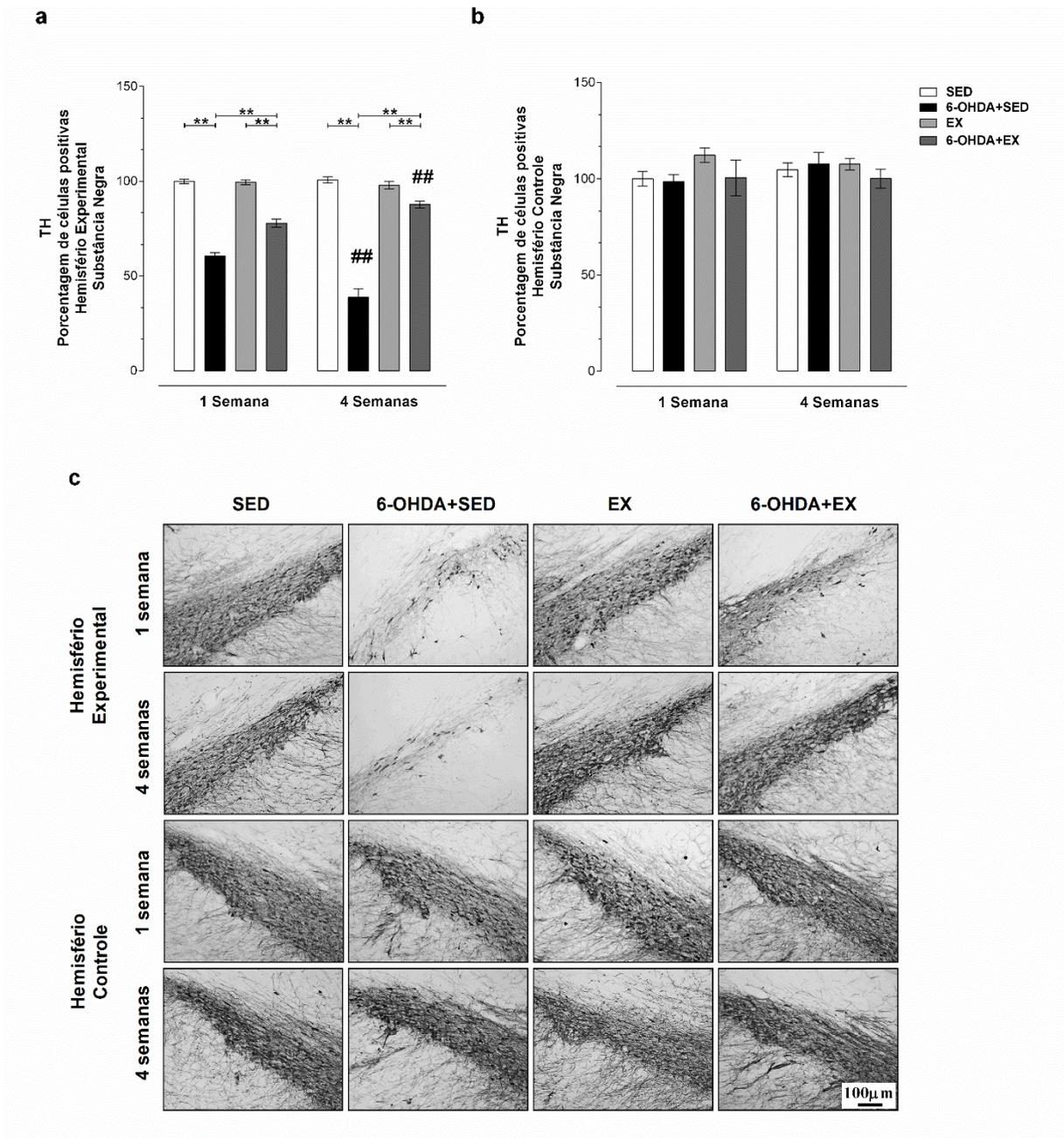
5.1.3.1 Substância Negra

Quando avaliada a expressão de TH na SNc no hemisfério experimental por imuno-histoquímica foi observado um efeito da injeção de 6-OHDA, do exercício físico e da duração [F(7,37)=25,339; $p < 0,001$]. Para os resultados referentes ao protocolo de uma semana, a contagem de células TH-positivas foi significativamente menor no grupo 6-OHDA+SED em relação ao grupo controle SED em cerca de 40% ($p < 0,001$). Trinta dias após a cirurgia, os animais 6-OHDA+SED também demonstraram uma redução nos níveis de TH de aproximadamente 62% ($p < 0,001$). Por sua vez, o grupo 6-OHDA+EX submetido ao protocolo de uma semana apresentou 30% ($p < 0,001$) mais marcação para TH do que o grupo DP sedentário, e esse número aumentou para 126% ($p < 0,001$) após quatro semanas de treinamento. Houve também um aumento de 13% ($p = 0,004$) para o grupo 6-OHDA+EX quando comparamos as diferentes durações analisados (Figura 5a e 5c).

Os resultados do *immunoblotting* também indicaram uma interação entre os fatores [F(7,38)=10,501; $p = 0,002$] no hemisfério experimental (Figura 7a). Os animais que receberam a droga apresentaram uma redução de cerca de 18% ($p = 0,023$) da expressão proteica de TH uma semana após a cirurgia e de aproximadamente 38% ($p < 0,001$) com quatro semanas após a cirurgia. Essa expressão também estava diminuída no grupo 6-OHDA+EX submetido ao protocolo de uma semana de treinamento (26%; $p < 0,001$), porém após quatro semanas um aumento na marcação foi encontrado no grupo 6-OHDA+EX (55%; $p < 0,001$) em comparação ao grupo 6-OHDA+SED.

No hemisfério controle não houve diferença significativa entre os grupos na expressão de TH na SNc pela análise de imuno-histoquímica (Figura 5b e 5c) [F(7, 37) < 0,001; $p = 0,988$] e *immunoblotting* [F(7,38)=0,034; $p = 0,854$] (Figura 7c).

Figura 5: Análise da expressão de TH da substância negra *pars compacta* (SNc) por imuno-histoquímica



Análise da expressão de TH do hemisfério experimental (a) e controle (b) da substância negra *pars compacta* (SNc) por imuno-histoquímica. Dados expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$; ## $p < 0,01$; * comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento. Imagens digitais representativas de cortes coronais da SNc (c).

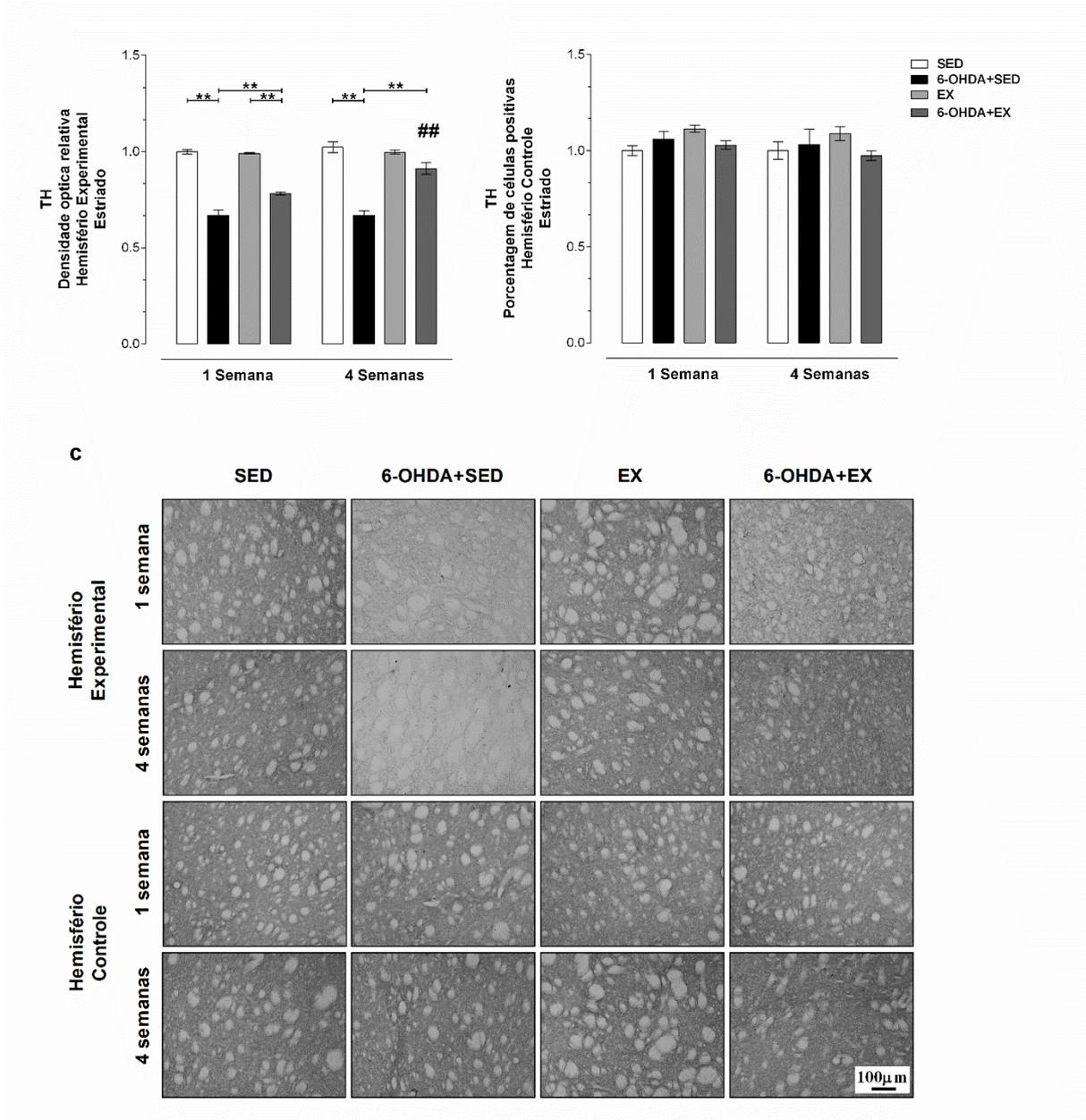
5.1.3.2 Estriado

As análises de TH no CPu por imuno-histoquímica, em relação ao hemisfério experimental, indicaram que houve um efeito da injeção de 6-OHDA, do exercício físico e das diferentes durações de protocolos de exercício físico [$F(7,37)=6,266$; $p=0,017$]. Desse modo, a densidade óptica para TH, uma semana após a cirurgia, foi significativamente menor no grupo 6-OHDA+SED em relação ao grupo SED em cerca de 33% ($p<0,001$). Quatro semanas após a cirurgia a expressão de TH foi significativamente menor no grupo 6-OHDA+SED em relação ao grupo SED (35%; $p<0,001$). Além disso, o grupo 6-OHDA+EX apresentou um aumento da marcação de TH em relação a 6-OHDA+SED de 16% após três sessões de corrida ($p<0,001$) e de 36% após doze sessões ($p<0,001$). Quando comparados os dados de um mês com os de uma semana observamos um aumento significativo de 17% no grupo 6-OHDA+EX treinado por quatro semanas ($p<0,001$) (Figura 6a e 6c).

Com relação à expressão de TH no CPu, lado experimental, avaliado pela técnica de *immunoblotting* [$F(7,38)=5,556$; $p=0,024$], também foi observada uma redução nos grupos 6-OHDA+SED em cerca de 37% após sete dias ($p<0,001$) e de 50% após trinta dias ($p<0,001$). Essa diminuição se manteve após três sessões de treinamento, com expressão 47% ($p<0,001$) menor quando comparado com o grupo controle EX. Entretanto, após doze sessões de treinamento houve um aumento de 51% ($p=0,004$) no grupo 6-OHDA+EX em comparação aos animais 6-OHDA+SED (Figura 7b).

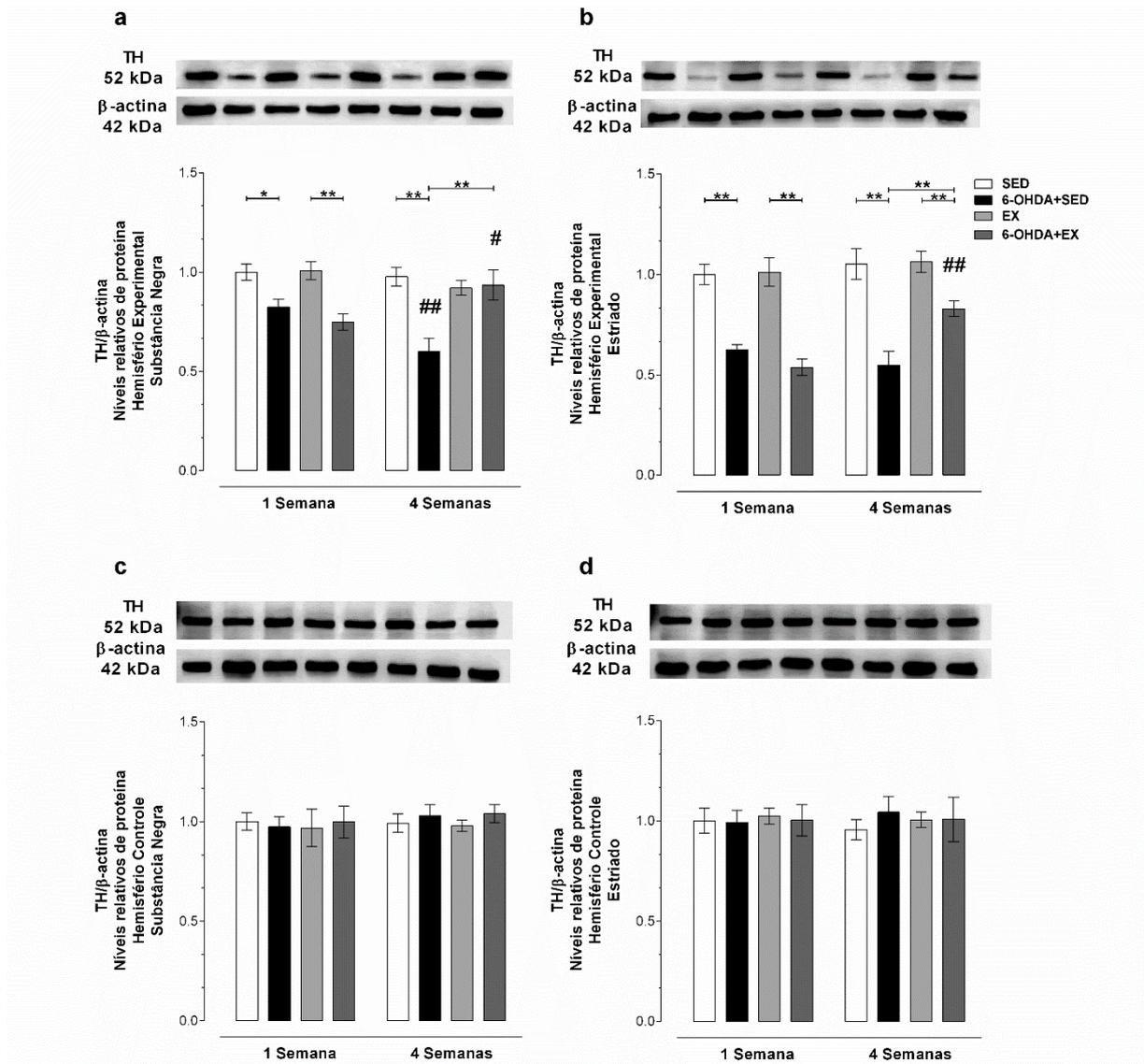
Não foi encontrada diferença entre os fatores analisados no hemisfério controle pelas técnicas de imuno-histoquímica [$F(7, 37)<0,001$; $p=0,992$] (Figura 6b e 6c) e *immunoblotting* [$F(7,38)=0,134$; $p=0,716$] (Figura 7d).

Figura 6: Análise da expressão de TH no estriado (CPu) por imuno-histoquímica



Análise da expressão de TH do hemisfério experimental (a) e controle (b) do estriado (CPu) por imuno-histoquímica. Dados expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$; ## $p < 0,01$; * comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento. Imagens digitais representativas de cortes coronais do CPu (c).

Figura 7: Análise da expressão de TH por *immunoblotting*



Análise da expressão de TH do hemisfério experimental (a) e controle (b) do estriado (CPu) e do hemisfério experimental (c) e controle (d) da substância negra pars compacta (SNc) por *immunoblotting*. Dados expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; * comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento.

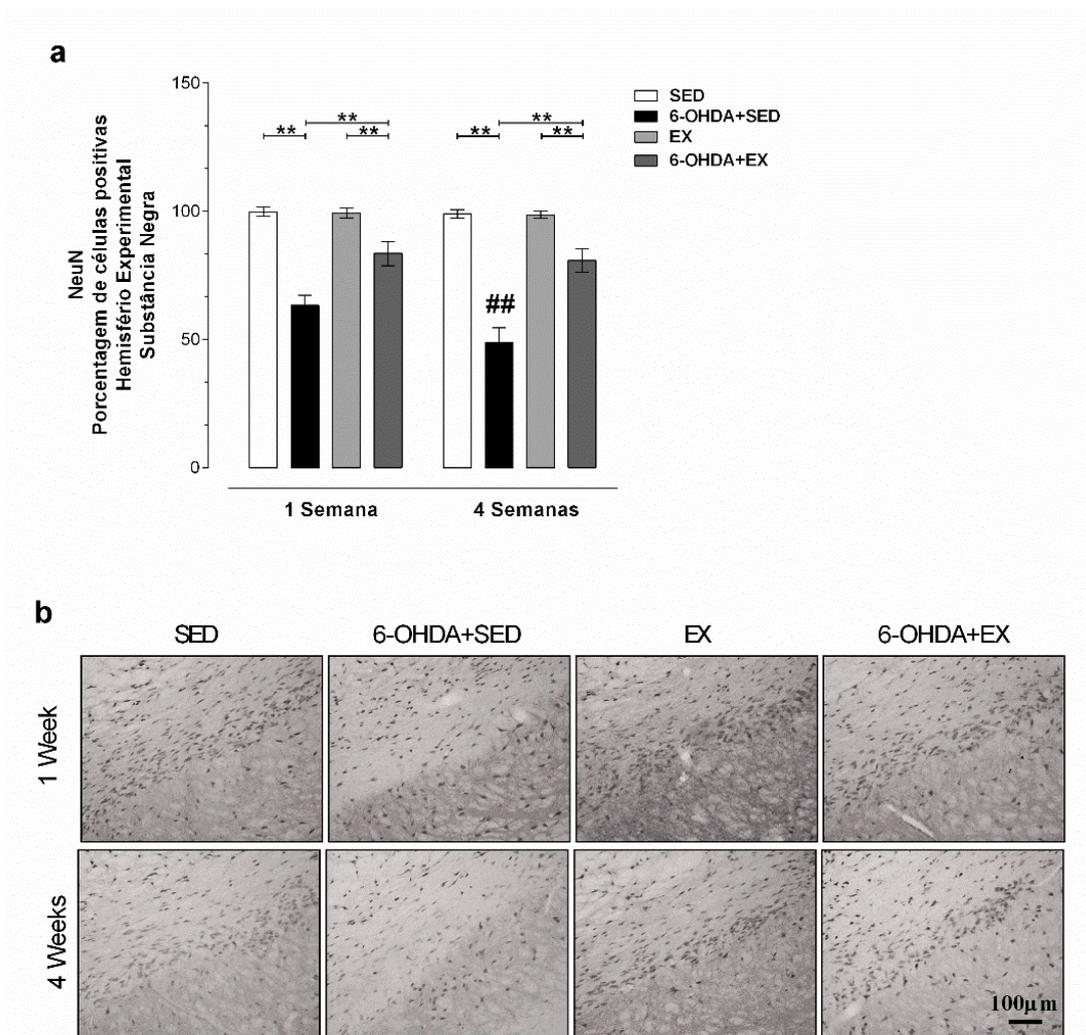
5.1.4 NeuN

5.1.4.1 Substância Negra

A análise da marcação de neurônios com o anticorpo anti-NeuN (Figura 8) indicam que houve efeito da 6-OHDA e do exercício sobre a quantidade de

neurônios positivos [F(3,37)=24,340; $p<0,001$]. Na comparação entre grupos observamos uma redução no número de neurônios nos animais sedentários que receberam a 6-OHDA de 36% uma semana após a indução do modelo ($p<0,001$) e de 50% quatro semanas após a indução do modelo ($p<0,001$). Por outro lado, o exercício físico foi capaz de proteger a perda neuronal, tendo em vista que o grupo 6-OHDA+EX nas duas durações de protocolo de treinamento analisadas apresentaram menor redução do número de células NeuN-positivas (17%, $p<0,001$). Ao compararmos o grupo 6-OHDA+EX com os animais 6-OHDA+SED observamos um aumento de 32% após três sessões de treinamento ($p<0,001$) e de 65% após doze sessões de treinamento ($p<0,001$) no número de neurônios.

Figura 8: Análise da expressão de NeuN.

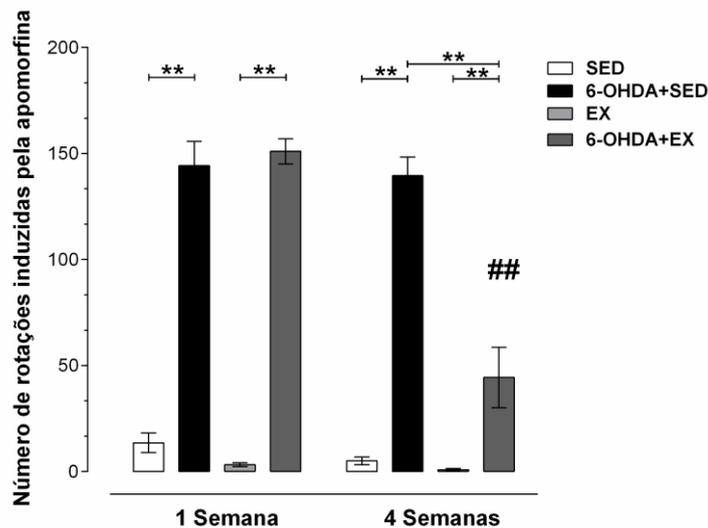


Análise da expressão de NeuN do hemisfério experimental (a) e controle (b) da substância negra pars compacta (SNc) por imuno-histoquímica. Dados expressos como média \pm EPM. ** $p<0,01$; ## $p<0,01$; * comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento. Imagens digitais representativas de cortes coronais da SNc (c).

5.1.5 Teste rotacional induzido por apomorfina

O teste rotacional induzido por apomorfina foi utilizado para analisar a lesão unilateral induzida pela injeção de 6-OHDA. A análise estatística revelou interação entre todos os fatores analisados [$F(7,40)=24,822$; $p<0,001$]. Ao longo de 30 minutos após a administração da apomorfina os animais 6-OHDA+SED rotacionaram uma média de 131 vezes a mais, sete dias após cirurgia ($p<0,001$), e 134 vezes a mais, trinta dias após cirurgia ($p<0,01$), em direção ao hemisfério corporal esquerdo, ou seja, contralateral à lesão, quando comparados aos respectivos controles SED. Após três sessões de treinamento o número de rotações foi semelhante, os animais rotacionaram uma média de 148 vezes mais do que seu controle (EX). Porém, depois de doze sessões esse número reduziu significativamente para apenas 44 rotações, representando uma diminuição de 95 rotações ($p<0,001$) comparada ao grupo 6-OHDA+SED (Figura 9).

Figura 9: Rotações assimétricas induzidas por apomorfina

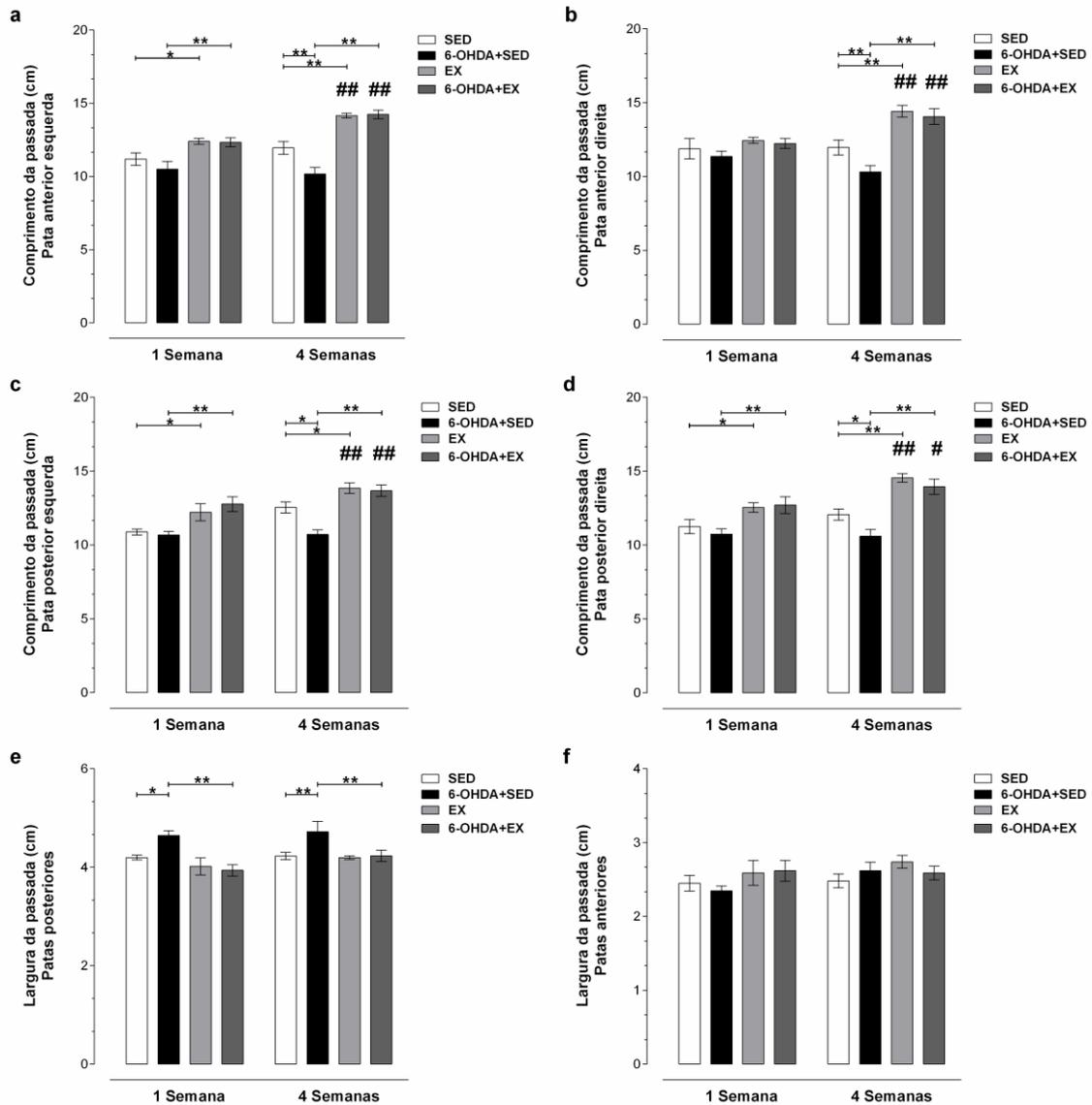


Número de rotações assimétricas para a esquerda induzidas por apomorfina. Dados expressos como média ± EPM. ** $p<0,01$; ## $p<0,01$; * comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento.

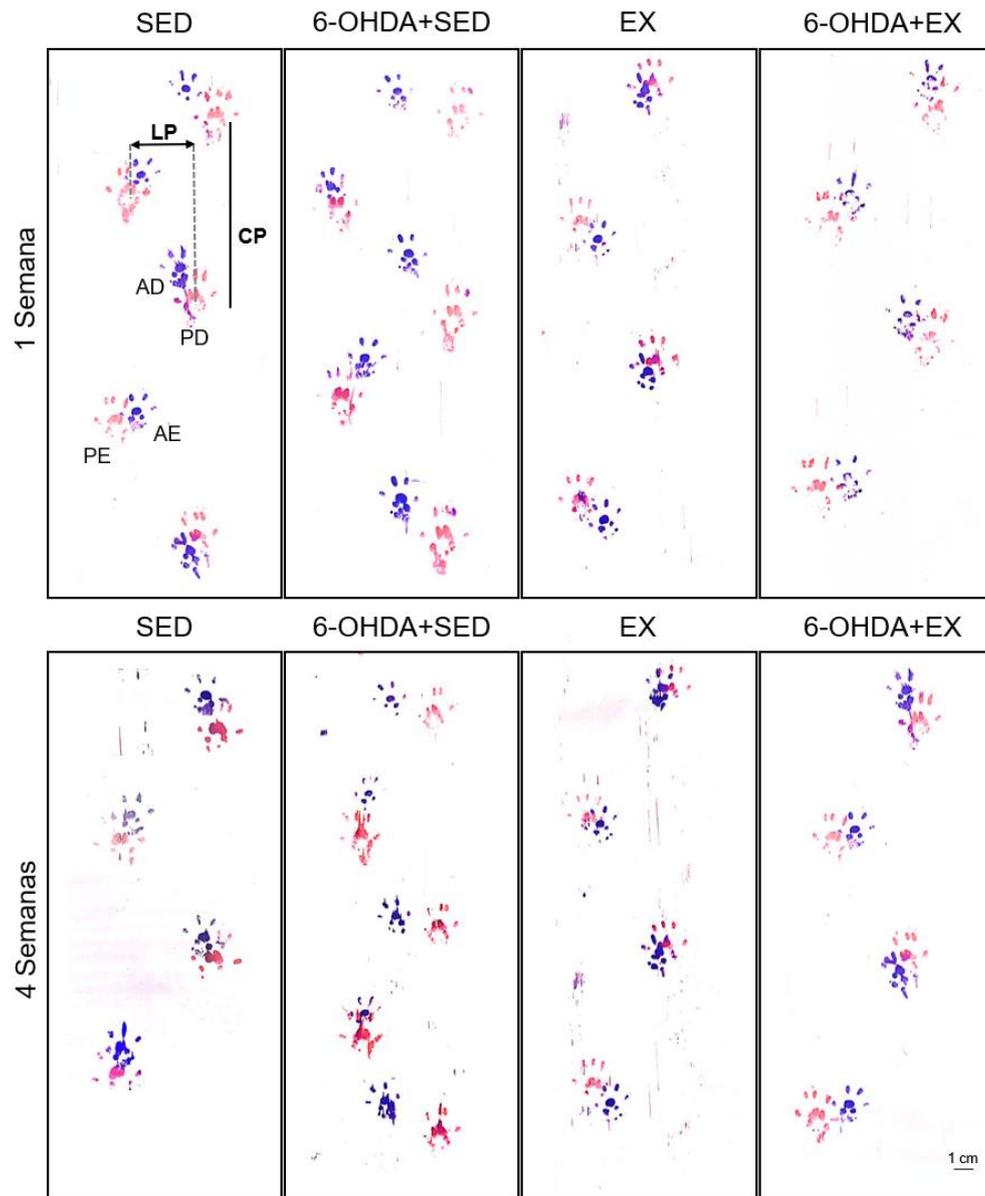
5.1.6 Teste de marcha

De modo geral, as análises da marcha indicam que os animais 6-OHDA+SED apresentaram uma alteração na marcha que foi acentuada ao longo do protocolo experimental (Figuras 10 e 11). Uma semana após a cirurgia os animais sedentários que receberam a toxina revelaram um aumento na largura da base de apoio das patas posteriores em cerca de 0,5 cm ($p=0,013$) quando comparados ao grupo SED. Essa alteração se manteve quatro semanas após a indução do modelo da DP ($p=0,006$) e, além disso, os animais 6-OHDA+SED também apresentaram um menor comprimento da passada, aproximadamente 1,7 cm menos que o grupo SED (pata anterior esquerda: 1,8 cm, $p=0,002$; pata anterior direita: 1,7 cm, $p=0,010$; pata posterior esquerda: 1,8 cm, $p=0,002$; pata posterior direita: 1,5 cm, $p=0,017$). Em relação aos animais exercitados, todos eles apresentaram maior comprimento da passada (aproximadamente 1,6 cm no grupo EX e 6-OHDA+EX por uma semana comparados ao SED e 6-OHDA+EX; 2,1 cm no EX por quatro semanas comparado ao SED e 3,6 cm no 6-OHDA+EX por quatro semanas comparado ao 6-OHDA+SED) e a alteração da largura da base de apoio das patas posteriores da passada foi revertida no grupo 6-OHDA+EX de uma ($p<0.001$) e quatro semanas de treinamento ($p=0,007$).

Figura 10: Análise da marcha dos animais



Análise da marcha dos animais medida em centímetros (cm). **(a)** Comprimento da passada da pata anterior esquerda, **(b)** comprimento da passada da pata anterior direita, **(c)** comprimento da passada da pata posterior esquerda, **(d)** comprimento da passada da pata posterior direita, **(e)** largura da passada entre as patas posteriores e **(f)** largura da passada entre as patas anteriores. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$; ### $p < 0,01$; * comparação dos grupos de um mesmo duração de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes durações de treinamento.



Imagens representativas do teste de marcha. Os parâmetros avaliados são sinalizados na figura. CP: comprimento da passada; LP: largura da passada; AD: pata anterior direita; PD: pata posterior direita; AE: pata anterior esquerda; PE: pata posterior esquerda.

5.2 Biogênese mitocondrial

5.2.1 PGC-1 α

5.2.1.1 Substância Negra

Na imunomarcção de PGC-1 α não foi observado efeito entre os três fatores analisados pela imuno-histoquímica [$F(7,38)=1,253$; $p=0,270$] (Figura 12a e 12c), o efeito está presente apenas entre os fatores indução do modelo da DP e exercício [$F(3,37)=56,821$; $p<0,001$], sendo que a contagem de células positivas para PGC-1 α foi significativamente menor no grupo 6-OHDA+SED em relação aos grupo controle SED no protocolo de uma semana (47%; $p<0,001$). Além disso, a marcação também foi significativamente menor no grupo 6-OHDA+SED em relação ao grupo SED para o protocolo de um mês (58%, $p<0,001$). O exercício foi capaz de proteger a redução de células PGC-1 α positivas, sendo que os animais 6-OHDA+EX submetidos ao treinamento de uma semana apresentaram 41% maior imunoreatividade para PGC-1 α ($p<0,01$) e os submetidos ao protocolo de quatro semanas mostraram aumento de 61% ($p<0,01$) quando comparados aos respectivos grupos 6-OHDA+SED.

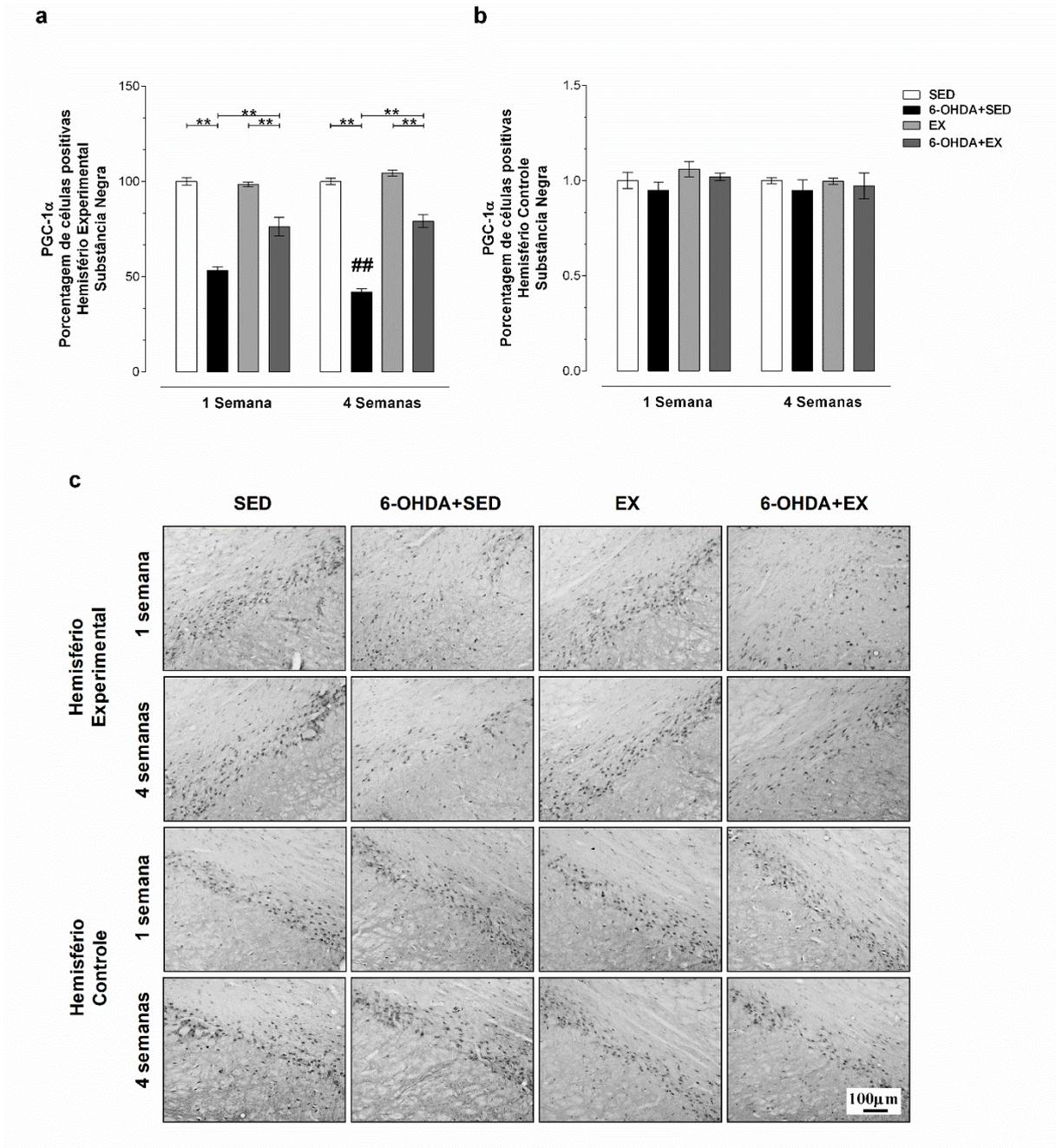
Para a técnica de *immunoblotting* não foi observada diferença entre os fatores [$F(7,38)=0,014$; $p=0,908$] (Figura 18a).

Também não foi observada diferença no hemisfério controle analisado por imuno-histoquímica [$F(7,37)=0,022$, $p=0,884$] (Figura 12b e 12c) nem por *immunoblotting* [$F(7,38)=1,628$; $p=0,210$] (Figura 18d).

5.2.1.2 Estriado

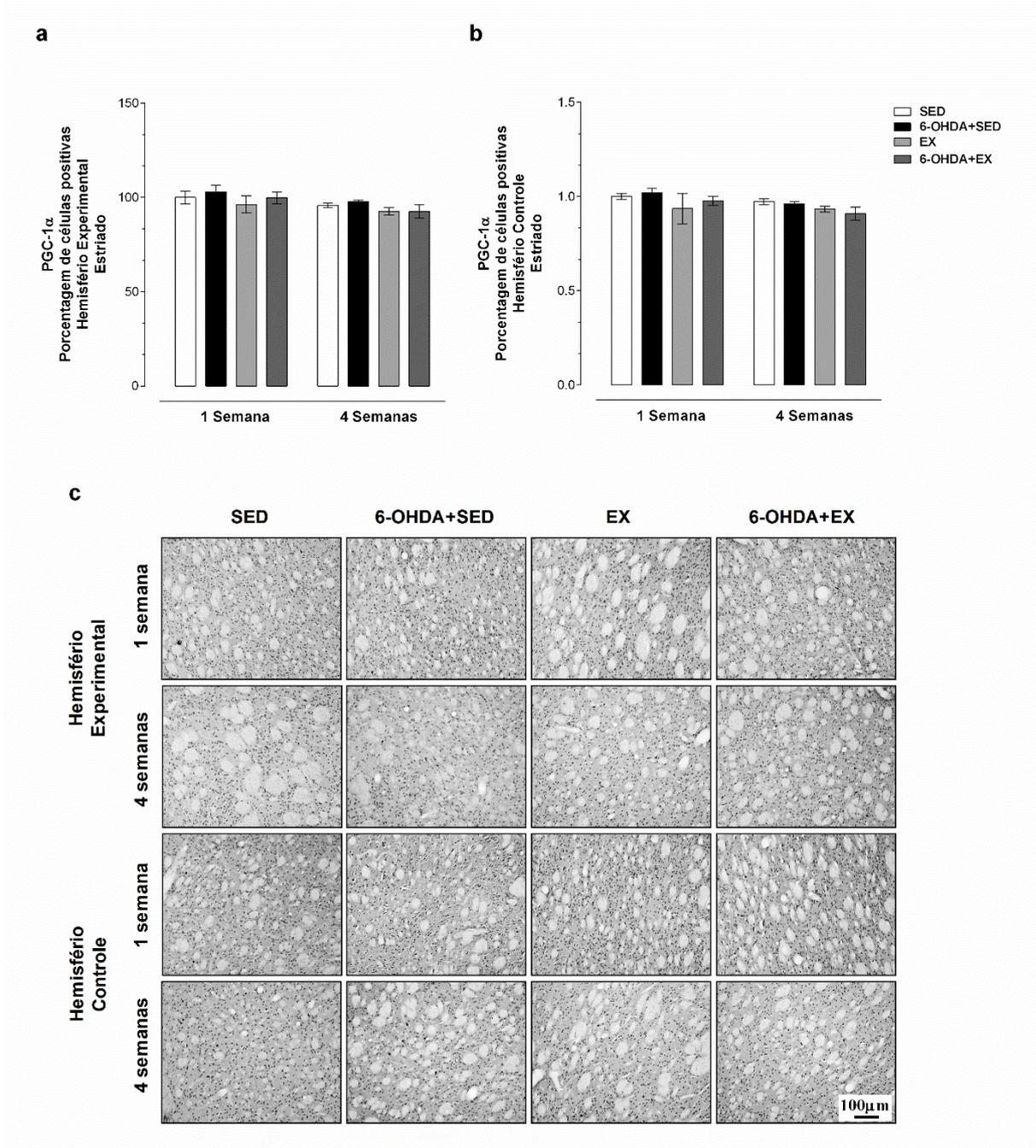
Não houve efeito do protocolo utilizado em nosso estudo na expressão de PGC-1 α no CPu do hemisfério experimental pela técnica de imuno-histoquímica (Figura 13) e de *immunoblotting* (Figura 19a e 19d) [$F(7,37)=0,087$; $p=0,770$; $F(7,38)=0,289$; $p=0,594$; respectivamente] e nem para o hemisfério controle [$F(7,37)=0,131$; $p=0,720$; $F(7,38)=0,059$; $p=0,809$; respectivamente].

Figura 12: Análise da expressão de PGC-1 α da substância negra *pars compacta* (SNc) por imuno-histoquímica



Análise da expressão de PGC-1 α do hemisfério experimental (a) e controle (b) da substância negra *pars compacta* (SNc) por imuno-histoquímica. Dados expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$; ## $p < 0,01$; * comparação dos grupos de um mesmo tempos de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento. Imagens digitais representativas de cortes coronais do SNc (c).

Figura 13: Análise da expressão de PGC-1 α do estriado (CPu) por imuno-histoquímica



Análise da expressão de PGC-1 α do hemisfério experimental (**a**) e controle (**b**) do estriado (CPu) por imuno-histoquímica. Dados expressos como média \pm EPM. Imagens digitais representativas de cortes coronais do CPu (**c**).

5.2.2 NRF-1

5.2.2.1 Substância Negra

Com relação aos dados de imuno-histoquímica do hemisfério experimental (Figura 14a e 14c), houve um efeito da injeção de 6-OHDA, exercício e duração do protocolo na expressão de NRF-1 [$F(7, 37)=25,571$; $p<0,001$]. Nessa região a quantidade de células NRF-1-reativas foi menor no grupo 6-OHDA+SED quando comparado ao grupo SED em animais submetidos ao protocolo de uma (33%, $p<0,001$) e quatro semanas (56%, $p<0,001$). O grupo 6-OHDA+EX também apresentou menor expressão (32%, $p<0,001$) em relação ao controle EX após três sessões de exercício em esteira. Porém, com um mês de treinamento houve um aumento de 90% ($p<0,001$) em relação ao grupo 6-OHDA+SED. A marcação para NRF-1 foi menor no grupo 6-OHDA+SED um mês após a indução do modelo (21%, $p<0,001$) quando comparado a uma semana.

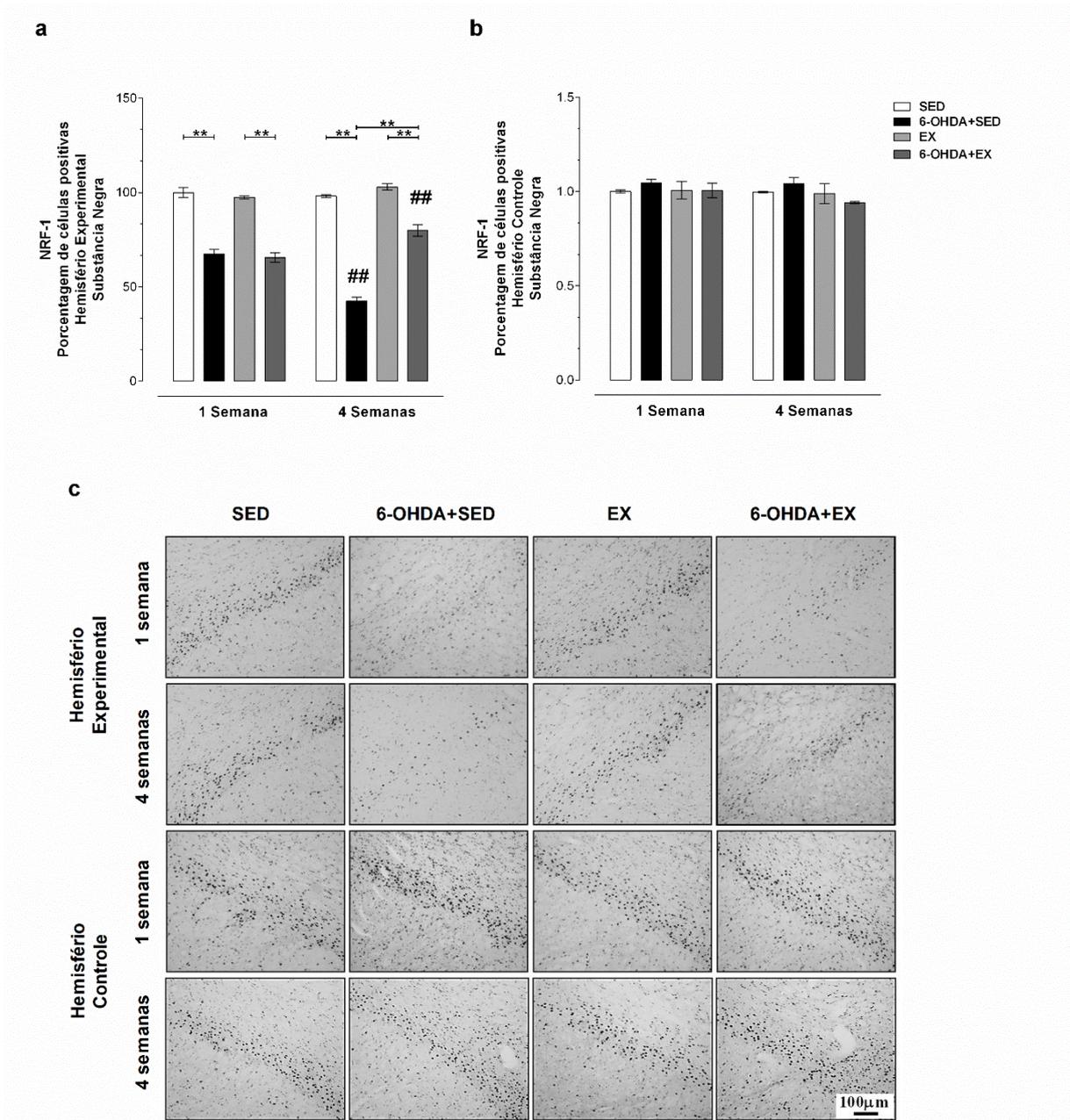
A técnica de *immunoblotting* (Figura 18b) demonstrou resultados semelhantes, revelando apenas efeito da injeção de 6-OHDA e do exercício [$F(3,38)=11,867$; $p=0,001$]. No pós-teste, notou-se que ambas durações do protocolo analisadas, ou seja, 1 e 4 semanas, no grupo 6-OHDA+SED apresentaram uma redução de cerca de 47% ($p<0,001$). Por outro lado, o exercício foi capaz de aumentar a marcação para NRF-1 no grupo 6-OHDA+EX, quando comparado ao grupo 6-OHDA+SED, submetido a três (54%; $p=0,003$) e doze (66%; $p<0,001$) sessões de treinamento.

O hemisfério contralateral à lesão não mostrou alterações na expressão de NRF-1 nos grupos analisados na imuno-histoquímica [$F(7, 37)=0,200$; $p=0,658$] (Figura 14b e 14c) e no *immunoblotting* [$F(7,38)<0,001$; $p=0,988$] (Figura 18e).

5.2.2.2 Estriado

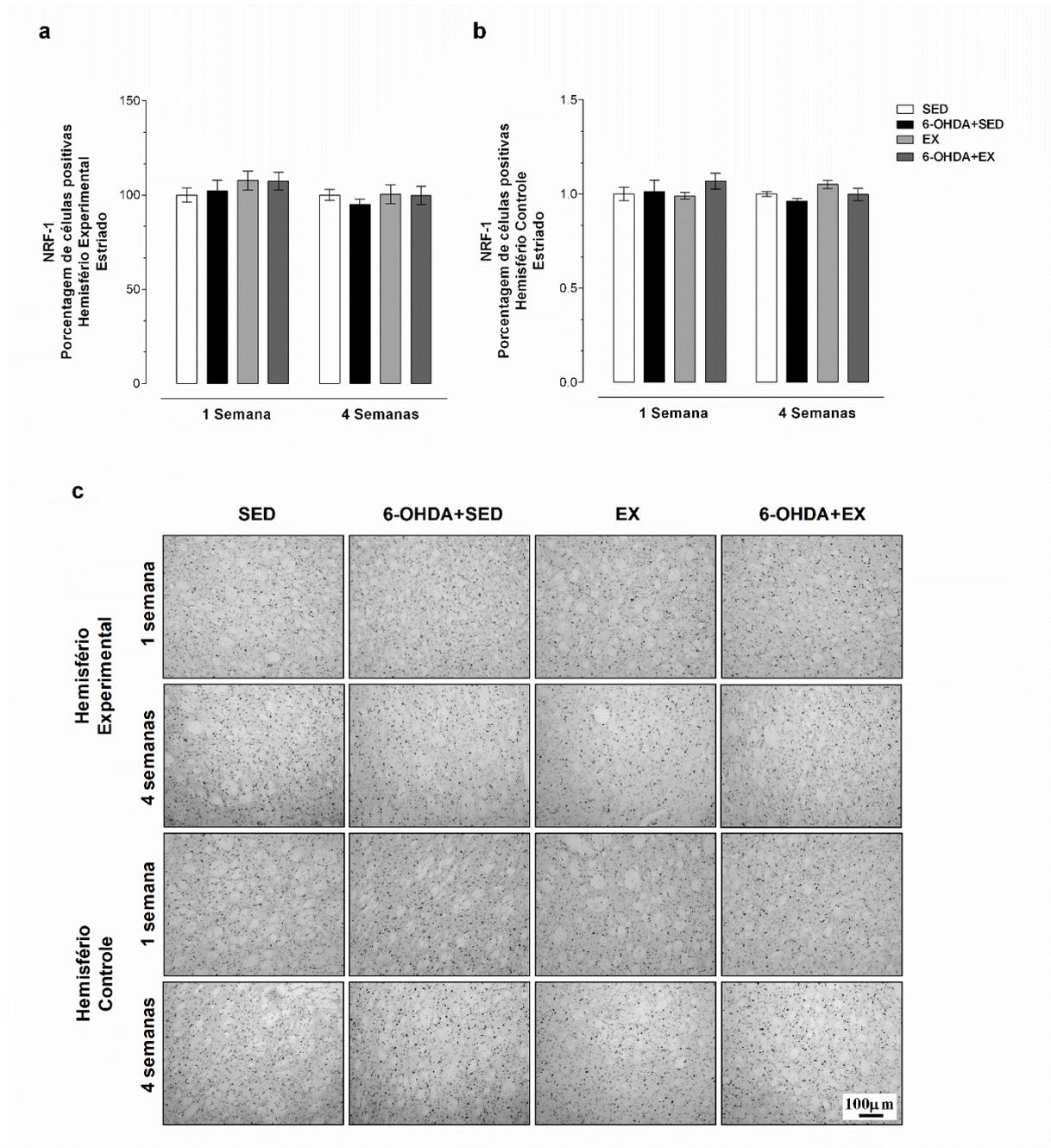
Não houve alterações na expressão de NRF-1 no CPu dos animais injetados com 6-OHDA analisados pela técnica de imuno-histoquímica (Figura 15) e *immunoblotting* em ambos hemisférios (Figura 19b e 19e) [hemisfério experimental [$F(7,37)=0,228$; $p=0,636$; $F(7,38)=0,039$; $p=0,845$; respectivamente] e no hemisfério controle [$F(7,37)=0,709$; $p=0,405$; $F(7,38)=0,010$; $p=0,919$].

Figura 14: Análise da expressão de NRF-1 da substância negra pars compacta (SNc) por imuno-histoquímica



Análise da expressão de NRF-1 do hemisfério experimental (a) e controle (b) da substância negra pars compacta (SNc) por imuno-histoquímica. Dados expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$; ## $p < 0,01$; * comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento. Imagens digitais representativas de cortes coronais da SNc (c).

Figura 15: Análise da expressão de NRF-1 do estriado (CPu) por imunohistoquímica



Análise da expressão de NRF-1 do hemisfério experimental (a) e controle (b) do estriado (CPu). Dados expressos como média \pm EPM. Imagens digitais representativas de cortes coronais do CPu por imunohistoquímica (c).

5.2.3 TFAM

5.2.3.1 Substância negra

Os resultados de imuno-histoquímica para a expressão de TFAM no hemisfério experimental da SNc (Figura 16a e 16c) indicaram um efeito dos três fatores analisados sobre a expressão proteica [$F(7,37)=4,785$; $p=0,035$]. A contagem de células positivas para TFAM foi menor no grupo 6-OHDA+SED quando comparado ao grupo SED (40%, $p<0,001$) e também foi menor no grupo analisado um mês após a indução do modelo da DP (48%, $p<0,001$) em relação ao respectivo grupo controle. Os animais submetidos às três sessões de exercício físico em esteira também mostraram redução de TFAM de 37% ($p<0,001$). Por outro lado, após doze sessões o número de células positivas para TFAM apresentou um aumento em relação ao grupo 6-OHDA+SED em 45% ($p<0,001$).

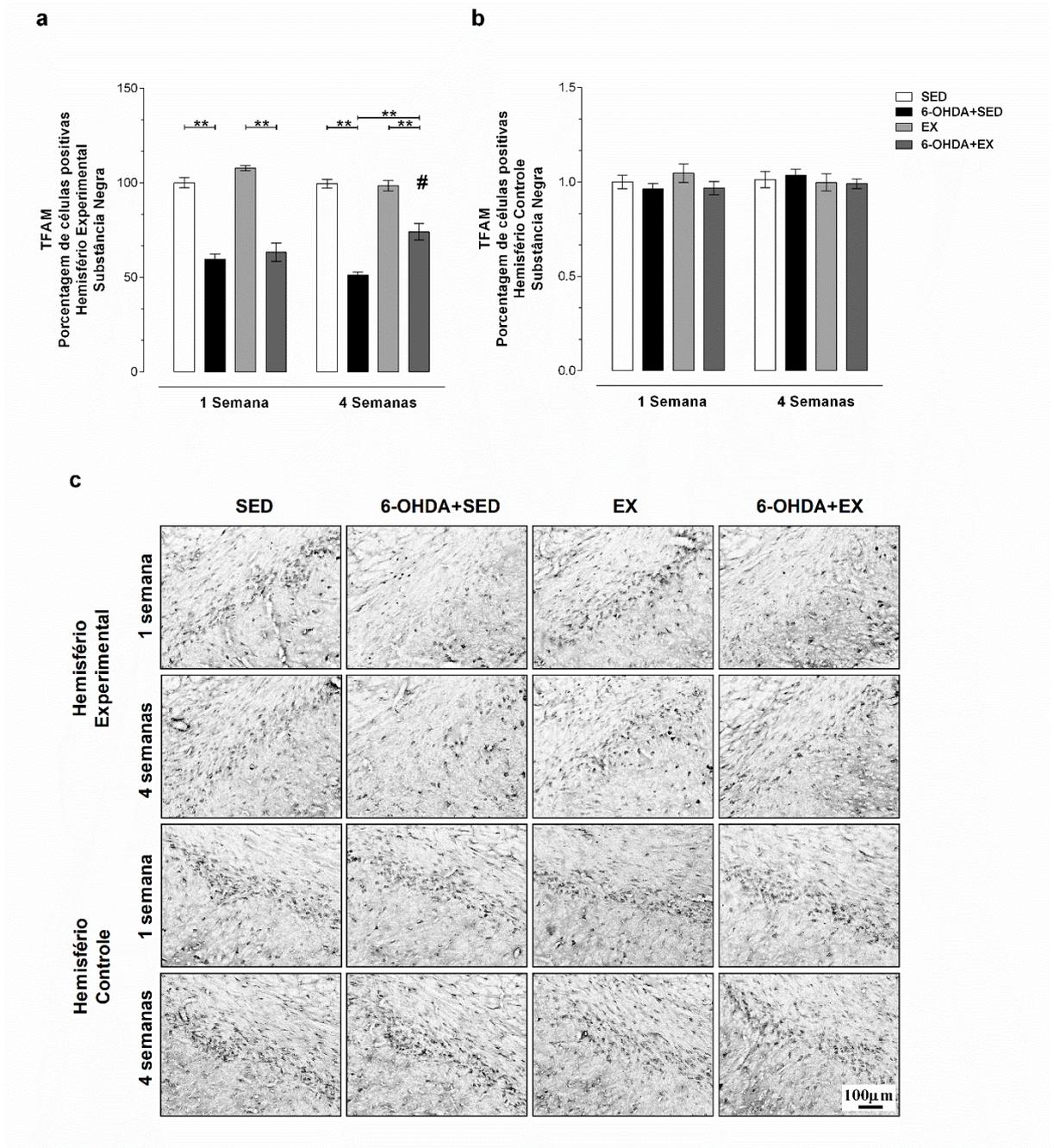
Os dados de *immunoblotting* (Figura 18c) revelaram interação entre os três fatores avaliados [$F(7,38)=5,133$; $p=0,029$]. Foi encontrada diferença nos animais submetidos ao protocolo de um mês, nos quais houve redução da expressão de TFAM no grupo 6-OHDA+SED de 21% ($p<0,001$) e um aumento de 16% ($p=0,005$) nos animais 6-OHDA+EX em relação ao 6-OHDA+SED, sendo que nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos 6-OHDA+EX e EX.

Com relação ao hemisfério contralateral à lesão, a análise de TFAM pelas técnicas de imuno-histoquímica (Figura 16b e 16c) [$F(7, 37)=0,010$; $p=0,920$] e *immunoblotting* [$F(7,38)=0,121$; $p=0,729$] (Figura 18f) não revelou diferença entre os grupos.

5.2.3.2 Estriado

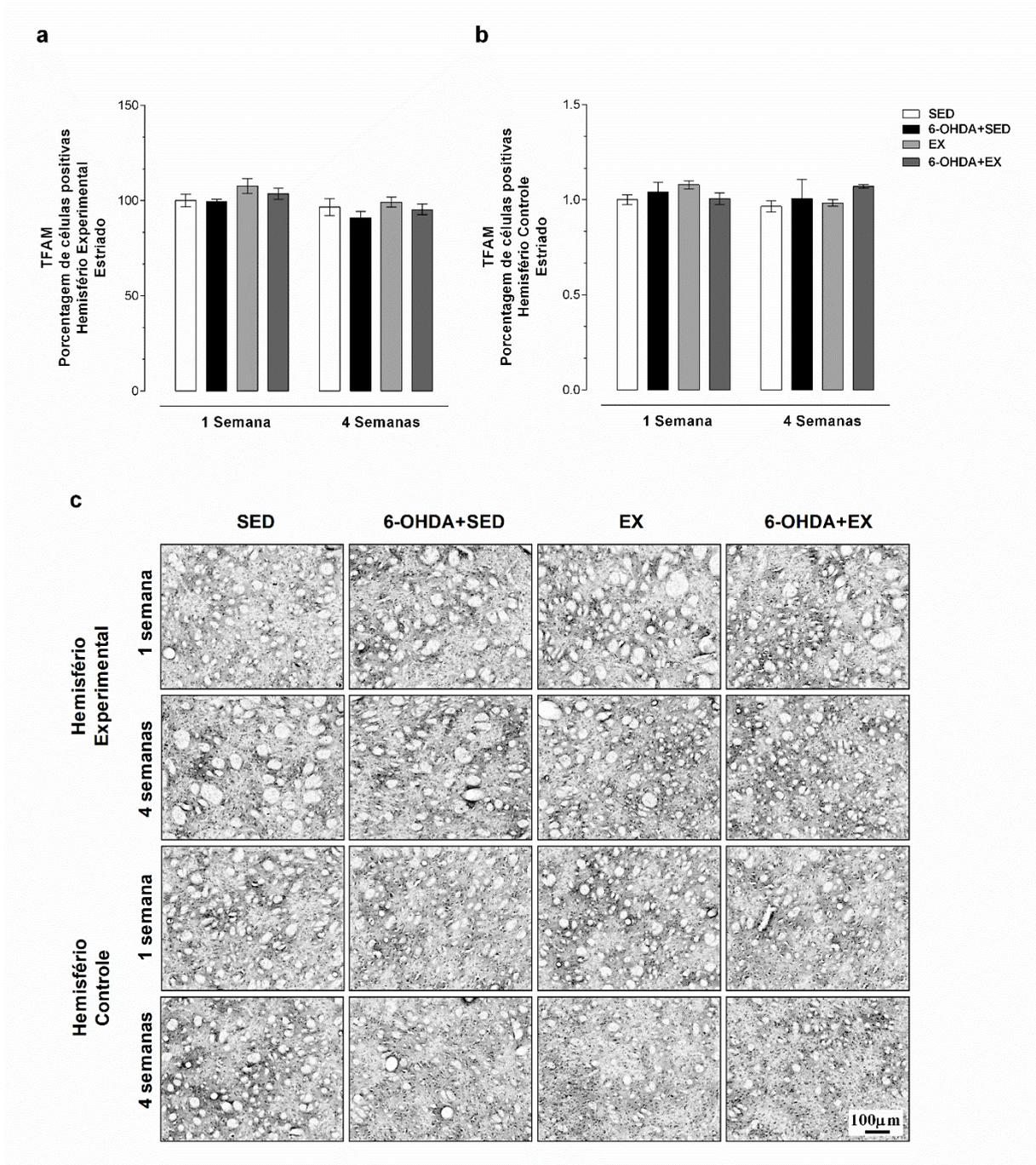
Não houve efeito dos fatores avaliados na expressão de TFAM no CPu pelas duas técnicas analisadas, imuno-histoquímica (Figura 17) e *immunoblotting* (Figura 19c e 19f), no hemisfério experimental [$F(7,37)=0,333$; $p=0,567$; $F(7,38)=2,156$; $p=0,150$; respectivamente] e no lado controle [$F(7,37)=1,428$; $p=0,240$; $F(7,38)=0,219$; $p=0,644$; respectivamente].

Figura 16: Análise da expressão de TFAM da substância negra *pars compacta* (SNc) por imuno-histoquímica



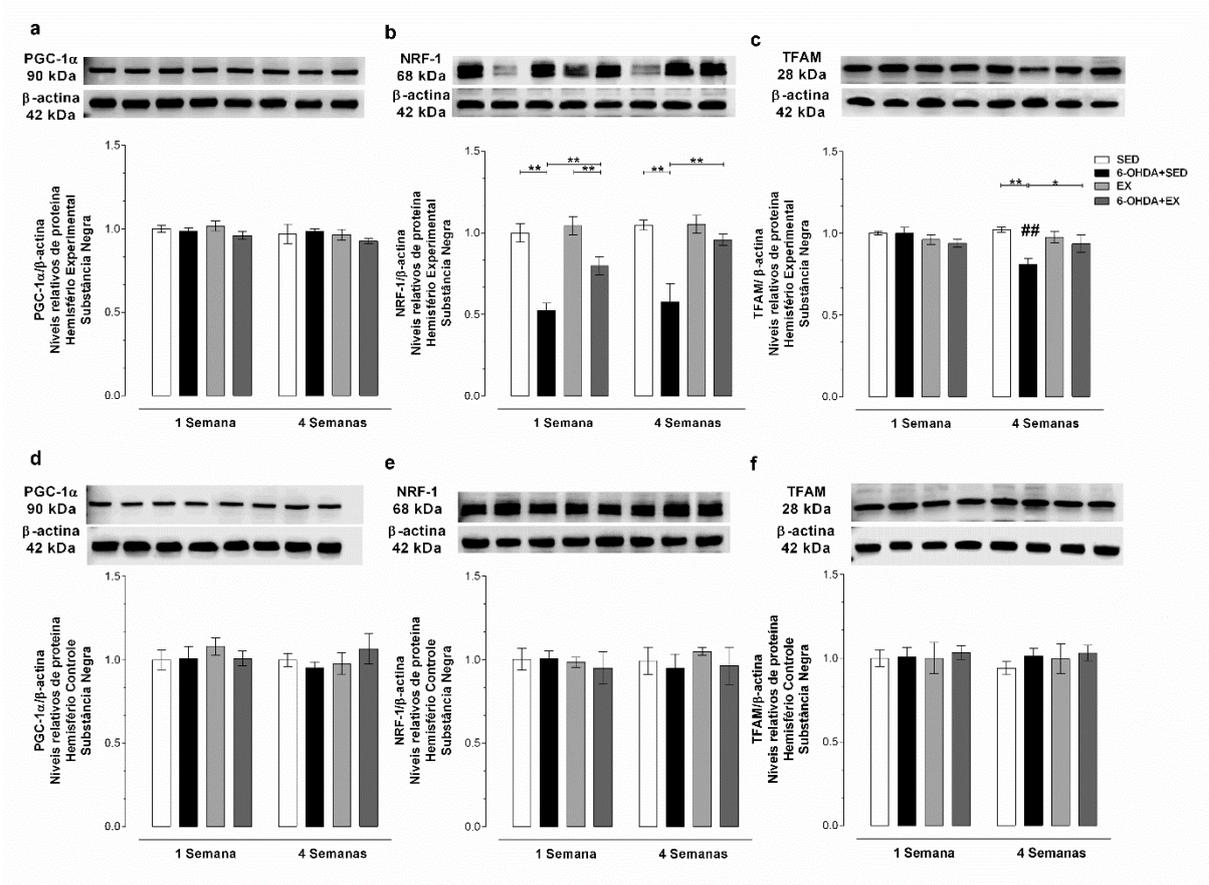
Análise da expressão de TFAM do hemisfério experimental (a) e controle (b) da substância negra *pars compacta* (SNc) por imuno-histoquímica. Dados expressos como média \pm EPM. ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$; * comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento. Imagens digitais representativas de cortes coronais da SNc (c).

Figura 17: Análise da expressão de TFAM do estriado (CPu) por imuno-histoquímica



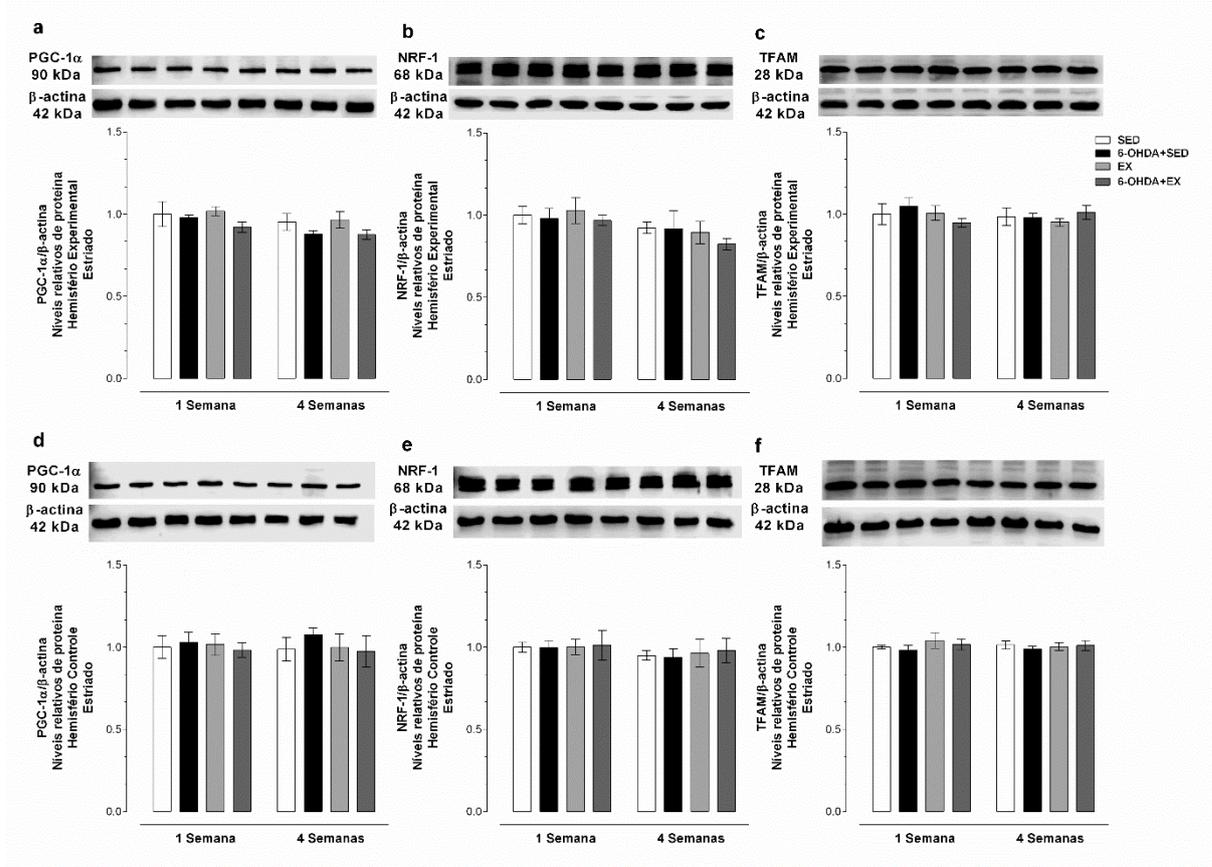
Análise da expressão de TFAM do hemisfério experimental (a) e controle (b) do estriado (CPu) por imuno-histoquímica. Dados expressos como média \pm EPM. Imagens digitais representativas de cortes coronais do CPu (c).

Figura 18: Análise da expressão proteica de PGC-1 α , NRF-1 e TFAM da substância negra por *immunoblotting*



Análise da expressão proteica do hemisfério experimental de PGC-1 α (a), NRF-1 (b) e TFAM (c) e do hemisfério controle de PGC-1 α (d), NRF-1 (e) e TFAM (f) da substância negra por *immunoblotting*. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ## $p < 0,01$; * comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento.

Figura 19: Análise da expressão proteica de PGC-1 α , NRF-1 e TFAM do estriado por *immunoblotting*



Análise da expressão proteica do hemisfério experimental de PGC-1 α (a), NRF-1 (b) e TFAM (c) e do hemisfério controle de PGC-1 α (d), NRF-1 (e) e TFAM (f) do estriado por *immunoblotting*. Dados expressos como média \pm EPM.

5.3 Função mitocondrial

5.3.1 OXPHOS

5.3.1.1 Substância Negra

Os fatores injeção, exercício e duração do protocolo afetaram a expressão de OXPHOS na SNc experimental pela análise dos dados da técnica de imunohistoquímica [$F(7,37)=5,455$; $p=0,025$] (Figura 20a e 20c). Para o protocolo de uma semana, observou-se que a densidade óptica para OXPHOS foi significativamente menor no grupo 6-OHDA+SED (49%, $p<0,001$) quando comparado ao grupo SED. No protocolo de quatro semanas, a expressão também se mostrou significativamente reduzida no grupo 6-OHDA+SED (51%, $p<0,001$) em relação ao grupo SED. Os animais 6-OHDA+EX que treinaram por três sessões também mostraram uma redução de 49% ($p<0,001$) na marcação de OXPHOS. No grupo 6-OHDA+EX por quatro semanas foi observado um aumento na imunoreatividade em cerca de 66% ($p<0,001$) comparado ao grupo 6-OHDA+SED.

Nos dados de *immunoblotting* (Figura 22) do hemisfério experimental observamos que apesar dos complexos II [$F(7,38)=0,007$; $p=0,935$], III [$F(7,38)=0,441$; $p=0,511$], IV [$F(7,38)=0,221$; $p=0,641$] e V [$F(7,38)=0,205$; $p=0,654$] não apresentarem diferença, os fatores injeção e o exercício [$F(3,38)=10,509$; $p=0,001$] e a duração e o exercício [$F(3,38)=3,936$; $p=0,05$] afetaram a expressão proteica do complexo I na SNc. Os grupos 6-OHDA+SED apresentaram menor expressão do complexo I em 26% uma semana após a cirurgia ($p<0,001$) e em 24% quatro semanas após a cirurgia ($p<0,001$) comparado ao grupo SED. Essa redução da expressão foi prevenida com doze sessões de exercício, onde observamos um aumento de 34% ($p=0,023$) em relação ao grupo 6-OHDA+SED. A análise de VDAC2, muito utilizado como marcador do conteúdo mitocondrial, também foi realizada nessa região, porém não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos [$F(7,38)=0,31$; $p=0,584$].

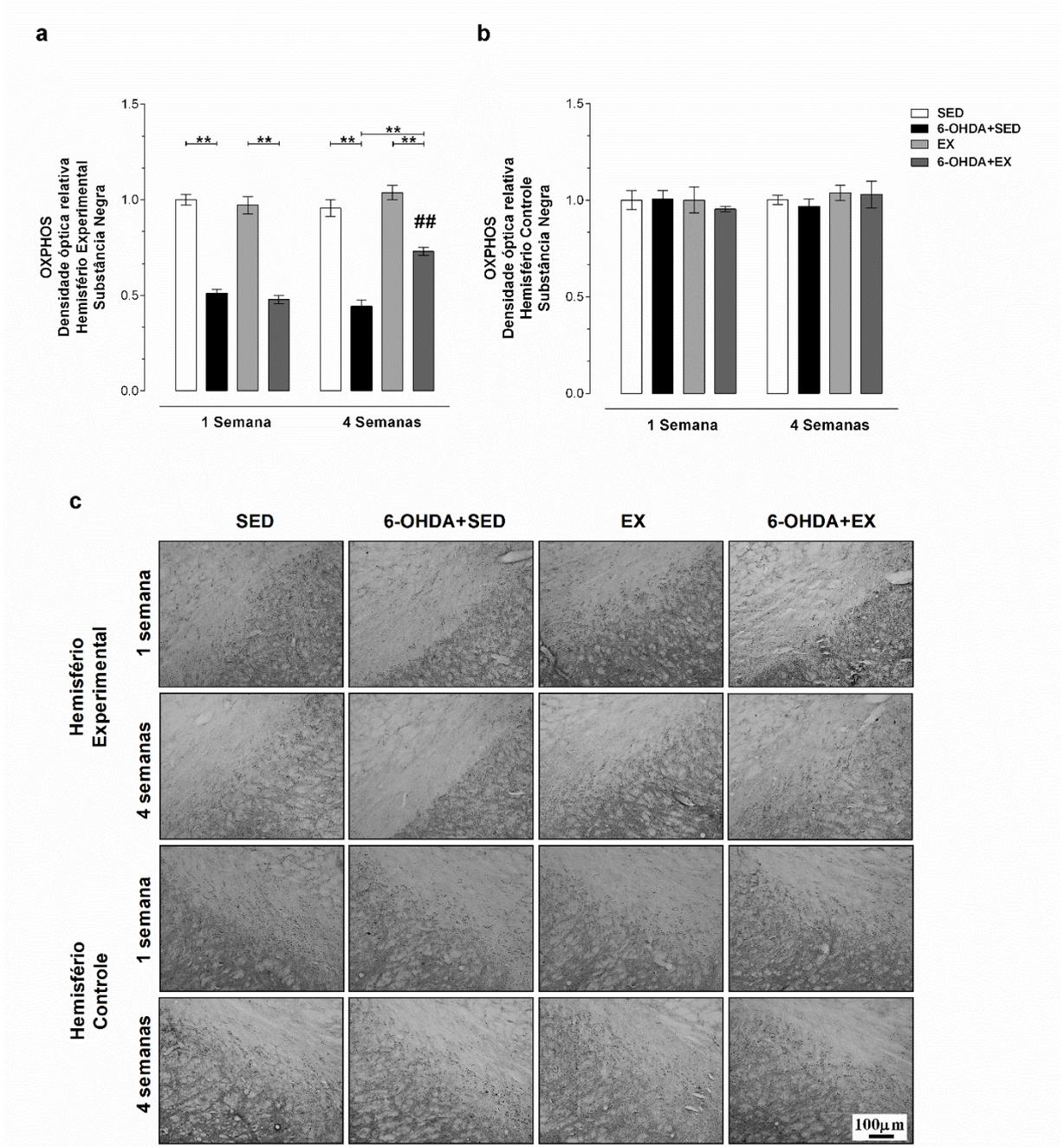
Para o hemisfério controle, não foi observado diferença entre os grupos na marcação de OXPHOS avaliada pelas técnicas de imunohistoquímica [$F(7,37)=0,329$; $p=0,569$] (Figura 20b e 20c) e *immunoblotting* {CI: [$F(7,38)=1,069$;

$p=0,308$]; CII: [$F(7,38)=0,012$; $p=0,912$]; CIII: [$F(7,38)=0,054$; $p=0,817$]; CIV: [$F(7,38)=0,194$; $p=0,662$]; CV: [$F(7,38)=0,718$; $p=0,402$]} (Figura 23).

5.3.1.2 Estriado

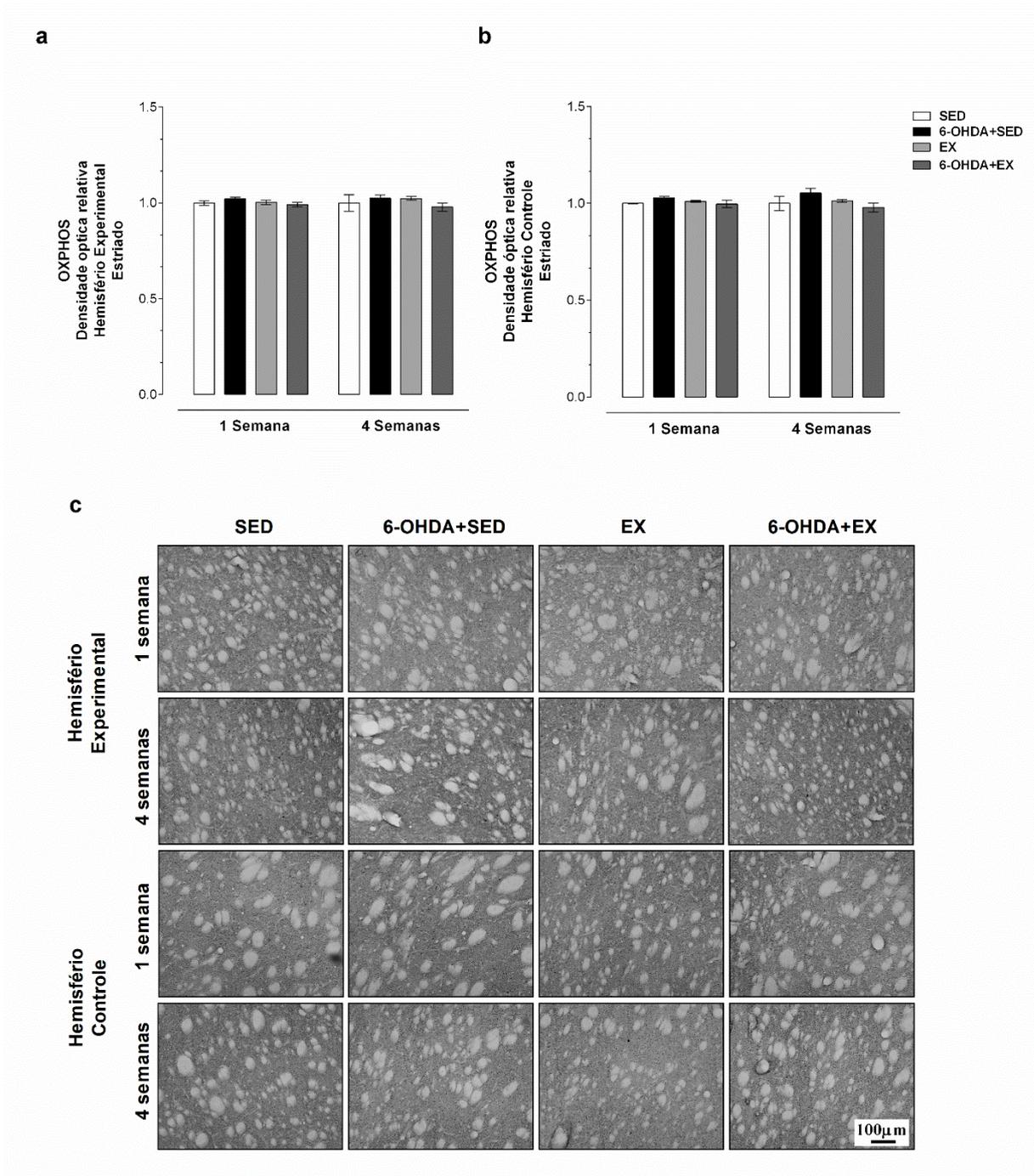
Os resultados da marcação de OXPHOS por imuno-histoquímica no CPu não mostraram diferença nos fatores analisados no hemisfério experimental [$F(7,37)=0,462$; $p=0,500$] (Figura 21a e 21c) e no hemisfério controle [$F(7,37)=0,725$; $p=0,405$] (Figura 21b e 21c). De modo semelhante, no hemisfério experimental (Figura 24) e no hemisfério controle (Figura 25) a expressão dos complexos mitocondriais não apresentaram diferenças entre os grupos avaliados por *immunoblotting* {hemisfério experimental - CI [$F(7,38)<0,001$; $p=0,995$], II [$F(7,38)=0,059$; $p=0,810$], III [$F(7,38)=1,058$; $p=0,310$], IV [$F(7,38)=0,024$; $p=0,879$] e V [$F(7,38)=0,091$; $p=0,764$]; hemisfério controle- CI: [$F(7,38)=0,011$; $p=0,918$]; CII: [$F(7,38)=0,857$; $p=0,360$]; CIII: [$F(7,38)=0,015$; $p=0,903$]; CIV: [$F(7,38)=0,050$; $p=0,824$]; CV: [$F(7,38)=0,018$; $p=0,893$]}.}

Figura 20: Análise da expressão de OXPPOS da substância negra *pars compacta* (SNc) por imuno-histoquímica



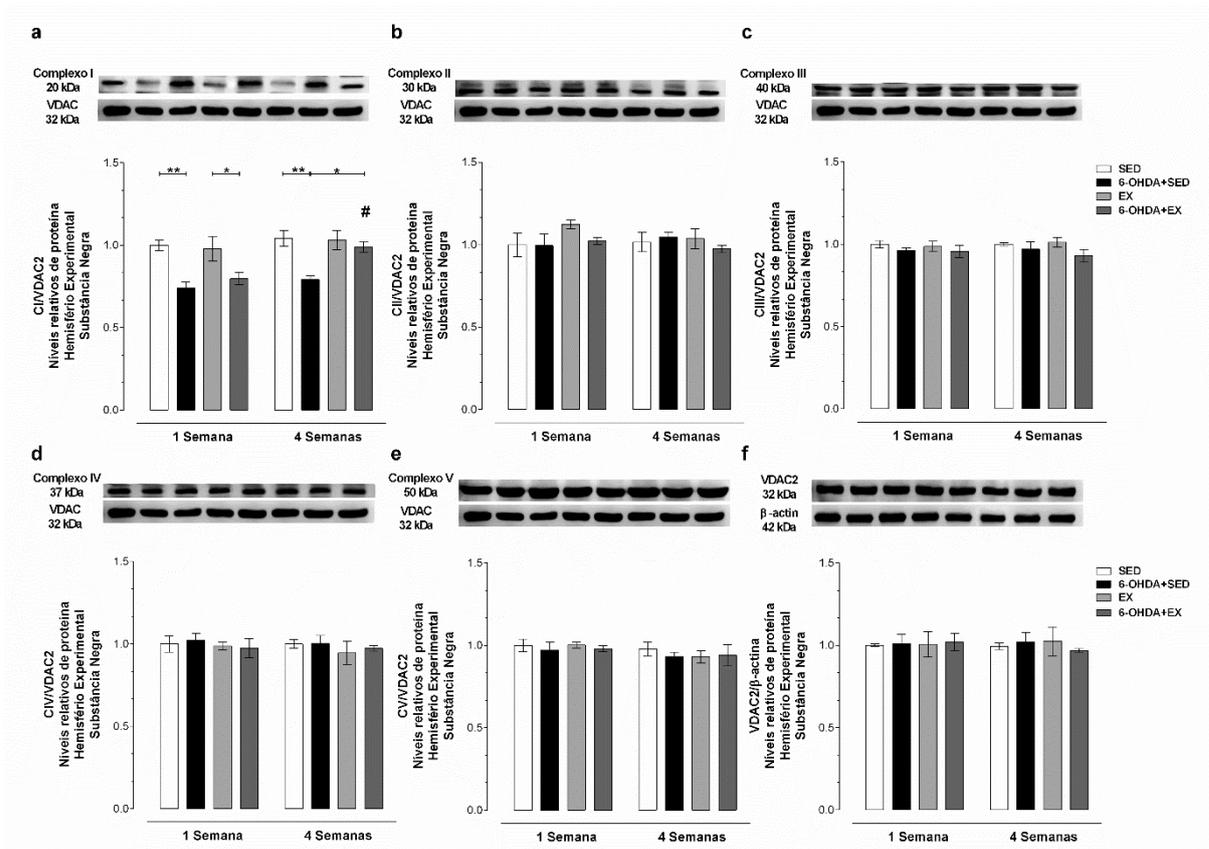
Análise da expressão de OXPPOS do hemisfério experimental (a) e controle (b) da substância negra *pars compacta* (SNc) por imuno-histoquímica. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$; * comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento. Imagens digitais representativas de cortes coronais da SNc (c).

Figura 21: Análise da expressão de OXPPOS do estriado (CPu) por imunohistoquímica



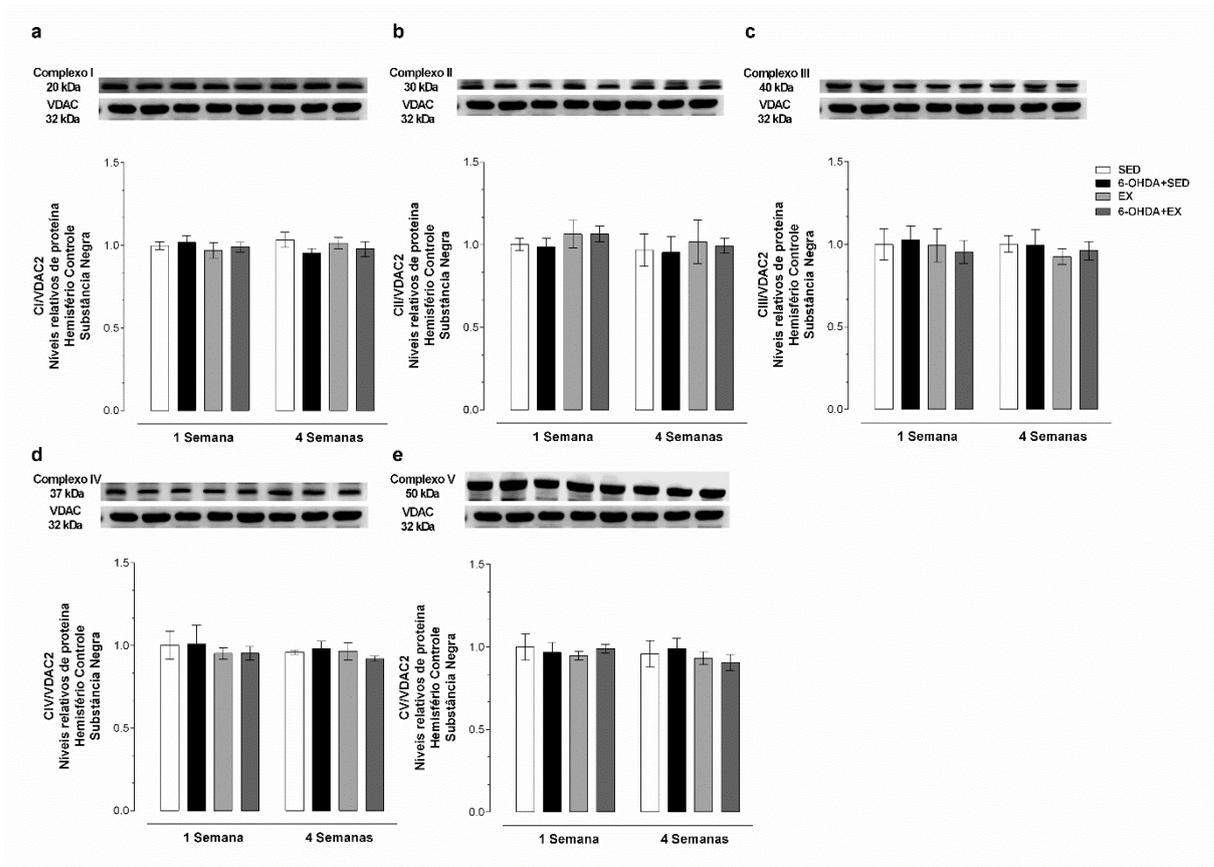
Análise da expressão de OXPPOS do hemisfério experimental (a) e controle (b) do estriado (CPu) por imunohistoquímica. Dados expressos como média \pm EPM. Imagens digitais representativas de cortes coronais do CPu (c).

Figura 22: Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais do hemisfério experimental da substância negra *pars compacta* (SNc) por *immunoblotting*



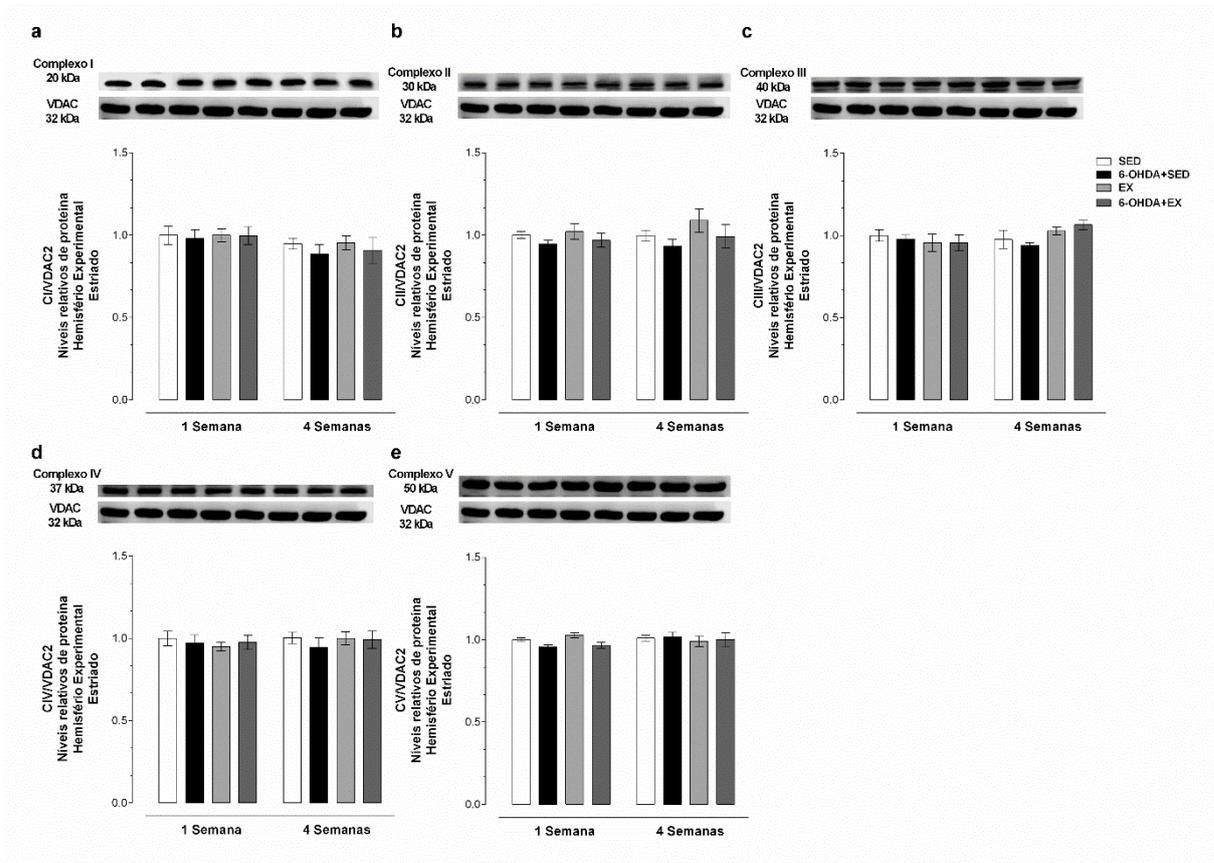
Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais: CI (a), CII (b), CIII (c), CIV (d) e CV (e), e de VDAC2 (f) do hemisfério experimental da substância negra *pars compacta* (SNc) por *immunoblotting*. Dados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$; * comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento.

Figura 23: Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais do hemisfério controle da substância negra *pars compacta* (SNc) por *immunoblotting*.



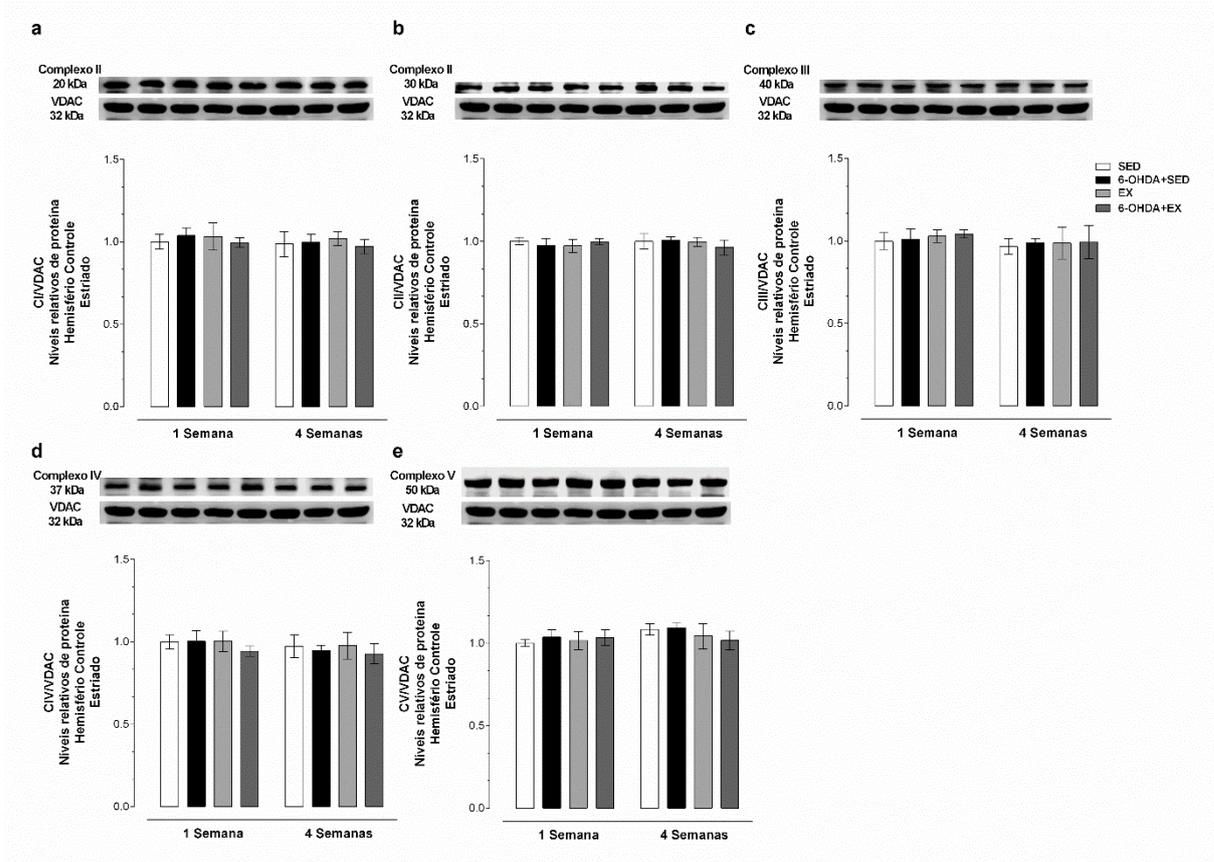
Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais: CI (a), CII (b), CIII (c), CIV (d) e CV (e) do hemisfério controle da substância negra *pars compacta* (SNc) por *immunoblotting*. Dados expressos como média \pm EPM.

Figura 24: Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais do hemisfério experimental do estriado (CPu) por *immunoblotting*



Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais: CI (a), CII (b), CIII (c), CIV (d) e CV (e) do hemisfério experimental do estriado (CPu) por *immunoblotting*. Dados expressos como média \pm EPM.

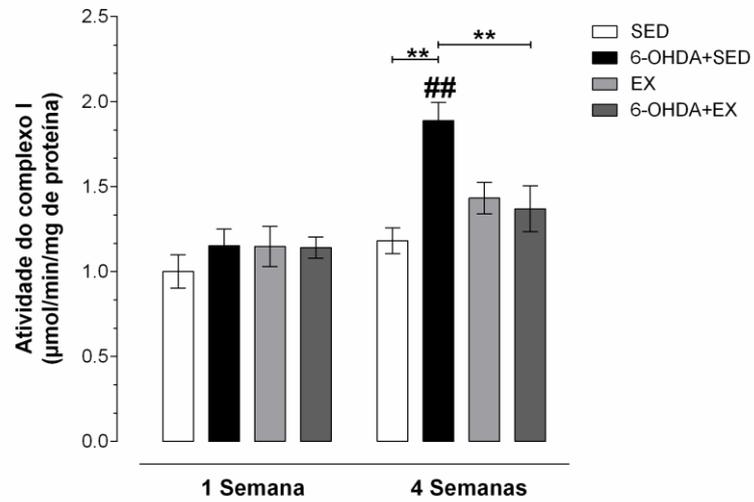
Figura 25: Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais do hemisfério controle do estriado (CPu) por *immunoblotting*



Análise da expressão dos complexos respiratórios mitocondriais: CI(a), CII (b), CIII (c), CIV (d) e CV (e) do hemisfério controle do estriado (CPu) por *immunoblotting*. Dados expressos como média \pm EPM.

5.3.2 Atividade enzimática do complexo I

Os dados da atividade enzimática do complexo I na substância negra revelaram efeito dos três fatores considerados em nosso estudo [$F(7,40)=4,623$; $p=0,038$]. Houve um aumento na atividade do complexo I na SNc no grupo 6-OHDA+SED, quatro semanas após a cirurgia, de cerca de 60% ($p<0,001$) quando comparados do grupo controle SED. Além disso, quatro semanas de exercício foram capazes de restaurar esse aumento, visto que não houve diferença entre o grupo 6-OHDA+EX e os grupos controles SED e EX (Figura 26).

Figura 26: Atividade enzimática do complexo I

Atividade mitocondrial do complexo I. Dados expressos como média \pm EPM. **p<0,01; ##p<0,01; # comparação dos grupos de um mesmo tempo de treinamento; # comparação do mesmo grupo entre diferentes tempos de treinamento.

6 DISCUSSÃO

A DP é uma patologia complexa cujos mecanismos ainda não estão completamente esclarecidos (KOULI; TORSNEY; KUAN, 2018). Uma das alterações descritas na DP são os déficits em mitocôndrias, organelas fundamentais no fornecimento de energia celular (MORTIBOYS *et al.*, 2018). Diante da ausência de terapias eficientes, o exercício físico tem se mostrado promissor, principalmente por retardar a progressão sintomática e prevenir o desenvolvimento da DP (CROWLEY; NOLAN; SULLIVAN, 2019). Além disso, o exercício físico parece ter um efeito benéfico na integridade mitocondrial por estimular tanto a função quanto a biogênese dessa organela (TANAKA *et al.*, 2019). Embora exista importante relevância do metabolismo mitocondrial nas doenças neurodegenerativas, pouco se sabe sobre suas funções na DP e como diferentes durações de treinamento físico podem atuar em tal organela. É nesse contexto que o presente trabalho se mostra importante ao demonstrar que o exercício físico foi capaz de atuar, progressivamente, restaurando as alterações da biogênese e função mitocondrial observadas no modelo unilateral da DP induzido por 6-OHDA.

Foi utilizado o modelo de indução da DP pela injeção unilateral de 6-OHDA no CPu, no qual há uma progressão lenta no quadro degenerativo, se assemelhando com o encontrado nos pacientes da doença (KONNOVA; SWANBERG, 2018). Além disso, com a dose injetada foi observada uma redução aproximada de 40% dos neurônios na SNc e 30% nos terminais dopaminérgicos no CPu uma semana após a cirurgia estereotáxica. Esses resultados condizem com o momento em que a doença é diagnosticada, que ocorre após perda de 40-60% de neurônios na SNc (GIGUERE; BURKE NANNI; TRUDEAU, 2018) e déficit de 20-50% de dopamina no CPu (LEE *et al.*, 2000). Também demosramos o efeito progressivo de ação da neurotoxina, visto que a porcentagem de células positivas para TH na SNc estava reduzida uma semana após a indução do modelo, e se mostrou ainda menor quatro semanas após a injeção estereotáxica. Portanto, o modelo utilizado mimetiza características importantes da doença, possibilitando uma correlação mais próxima com os pacientes da DP.

Com relação ao protocolo de exercício utilizado, os resultados confirmam o efeito neuroprotetor do exercício. Foi observada uma divergência na expressão de TH entre as técnicas utilizadas, que pode ser devido ao fato de que no

immunoblotting regiões maiores (estriado inteiro e mesencéfalo) são utilizadas. Apesar dessa diferença, existe um aumento na expressão dessa enzima nos animais treinados por quatro semanas, indicando que o treinamento em esteira foi capaz de melhorar os níveis de TH no grupo de animais parkinsonianos treinados. Esse achado vai de acordo com resultados anteriores que utilizaram ratos treinados por quatro semanas, 3x/semana (REAL *et al.*, 2013; GARCIA; REAL; BRITTO, 2017; REAL; GARCIA; BRITTO, 2017) e com outros trabalhos que também avaliaram ratos treinados diariamente por 14 dias (DA COSTA *et al.*, 2017), 3-4x/dia durante oito semanas (TUON *et al.*, 2015) e camundongos submetidos a exercício em esteira 5x/semana por seis semanas (AGUIAR *et al.*, 2016). Todos os estudos citados acima também demonstraram a manutenção dos níveis de TH nos animais treinados submetidos ao modelo 6-OHDA.

Os testes comportamentais, teste rotacional induzido por apomorfina e análise de marcha, corroboram esses achados ao revelarem melhoras em todos os aspectos analisados após quatro semanas de exercício. Além da expressão de TH, o teste da apomorfina é também utilizado para avaliar lesões unilaterais em modelos animais da DP (DUNNETT; TORRES, 2012). Quando esses animais recebem a injeção de apomorfina, eles exibem um comportamento rotacional assimétrico quantificável. Nesse estudo, tanto os animais DP sedentários quanto os exercitados por três sessões apresentaram esse comportamento anormal. Além disso, os animais DP exercitados por doze sessões revelaram uma atenuação desse comportamento, indo de acordo com os resultados de TH.

Também fizemos avaliações do comportamento motor por meio da análise da marcha. Os distúrbios da marcha são comuns em pacientes com DP, uma vez que os núcleos da base estão envolvidos nos movimentos voluntários (DEXTER; JENNER, 2013). Logo, danos nessa região são associados com alterações da marcha, e os principais sintomas da DP, bradicinesia, acinesia e tremor em repouso, interferem nos padrões de marcha (LAU *et al.*, 2011). Muitos estudos encontraram distúrbios da marcha em pacientes com DP (LAU *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013), como redução do comprimento da passada e aumento da largura da passada, o que também foi observado em modelos animais da DP (GELDENHUYS *et al.*, 2015; ROSTOSKY; MILOSEVIC, 2018). Nossos dados revelam comprometimentos da marcha sete dias após a administração da 6-OHDA, onde uma maior largura da passada foi observada, porém um dano maior foi encontrado um mês após a

indução da DP, onde os animais também revelaram um menor comprimento da passada. Entretanto, o exercício físico conseguiu reverter essas alterações, como observado em outros estudos (CHUANG *et al.*, 2017; RAFFERTY *et al.*, 2017). Tomados em conjunto, esses resultados confirmam um efeito progressivo da ação do exercício físico.

No presente estudo observamos uma redução nas células positivas para NeuN no grupo 6-OHDA+SED, estando em conformidade com a marcação para TH. Porém, nas duas durações do exercício físico os animais apresentaram a mesma porcentagem de NeuN, diferindo da marcação para TH. Uma diminuição na produção de TH pode ocorrer sem que haja morte neuronal, conforme visto por Cohen e colaboradores (2011), os quais demonstraram maior redução de TH do que de neurônios da SN duas semanas após administração de 6-OHDA (COHEN; ZIGMOND; SMITH, 2011). De acordo com nossos resultados, sugerimos que o exercício físico pode agir protegendo os neurônios da SNc contra a morte celular, e ainda é capaz de recuperar os níveis de TH com decorrer do tempo. Uma sequência de eventos que ocorre nos neurônios dopaminérgicos desde o momento de administração da neurotoxina até a finalização do nosso protocolo de quatro semanas de exercício pode ser suposta com base nesses resultados e na literatura.

Considerando que nosso protocolo de exercícios inicia dois dias após a administração de 6-OHDA, uma molécula altamente oxidável, e que sua ação começa em algumas horas, quando o treinamento começa a toxina já causou algum dano, como nossos dados mostraram. Stott e Barker (2014) avaliaram a injeção de 6-OHDA no estriado de camundongos e acompanharam a lesão através de diferentes pontos no tempo, de 3 horas a 12 dias após a cirurgia. Neste estudo, foi observado que a neurotoxina inicia sua ação imediatamente, com redução de TH no CPu e alterações nas fibras SNc após 6 horas. Além desse efeito imediato, também foi relatado que as alterações no tamanho e comprimento dendrítico e a expressão gênica de TH no SNc leva mais tempo para ocorrer, bem como que a redução na marcação de TH nos neurônios dopaminérgicos foi significativa apenas 6 dias após a cirurgia (STOTT; BARKER, 2014). Com o estímulo do exercício físico processos neuroprotetores são desencadeados, porém após poucas sessões ainda encontramos prejuízos nas expressões proteicas, como a redução na produção de TH pelos neurônios dopaminérgicos, tornando sua marcação pela imunohistoquímica e expressão por *immunoblotting* difíceis de serem visualizadas, porém

os axônios e corpos neuronais ainda se encontram presentes (HOU *et al.*, 2017). Após uma duração maior de treinamento, essa produção parece ser recuperada, sugerindo uma ação progressiva do exercício físico, que é capaz de proteger contra a morte neuronal e recuperar os níveis de TH ao longo do tempo.

Os resultados das análises referentes ao hemisfério controle indicam que não houve alteração na expressão de nenhuma das proteínas analisadas através da técnica de imuno-histoquímica e *immunoblotting*. Alguns estudos indicam a presença de mecanismos compensatórios nos neurônios sobreviventes, que ao diminuir a recaptção ou aumentar a síntese de dopamina acabam por compensar a ausência dos outros neurônios (ARKADIR; BERGMAN; FAHN, 2014). Entretanto, esse mecanismo compensatório parece ocorrer apenas quando as taxas degenerativas são maiores que 60% (ROBINSON; CASTANEDA; WHISHAW, 1990; SONG; HABER, 2000), o que pode explicar os resultados obtidos, já que em nosso estudo houve morte de aproximadamente 60% quatro semanas após a cirurgia.

Na avaliação das proteínas relacionadas à função e biogênese mitocondrial (PGC-1 α , NRF-1, TFAM, OXPHOS) foi observada uma redução na expressão de todas elas apenas na SNc, além da diminuição da expressão e alterações na atividade do complexo I, logo após uma semana da indução do modelo da DP. Quando avaliadas estas proteínas no período de um mês após a indução da doença um perfil de expressão semelhante ocorreu. PGC-1 α é um fator transcricional que participa da regulação da biogênese mitocondrial ao ativar NRF-1 e TFAM, que por fim ativa genes responsáveis pela síntese de proteínas mitocondriais, como as que compõem a CTE (PALIKARAS *et al.*, 2017). OXPHOS, por sua vez, compreende os complexos respiratórios I, II, III, IV e V (TILOKANI *et al.*, 2018). Logo, nossos resultados sugerem déficits na biogênese e função mitocondrial no grupo 6-OHDA+SED, o que vai de acordo com estudos em humanos que encontraram menor expressão de PGC-1 α e déficits nos genes da CTE em neurônios dopaminérgicos (ZHENG *et al.*, 2010), redução na expressão gênica do complexo I no córtex frontal (THOMAS *et al.*, 2012), menor quantidade dos complexos I e II e redução de genes que codificam TFAM na SN (GRUNEWALD *et al.*, 2016). E também corroboram com trabalhos envolvendo modelos da DP, como no modelo *in vitro* de rotenona, onde uma diminuição da expressão proteica de PGC-1 α foi encontrada (PENG *et al.*, 2017).

Apesar de estudos anteriores mostrarem alterações mitocondriais no CPu, nós as encontramos apenas na SNc (TUON *et al.*, 2015; CHUANG *et al.*, 2017). Quando comparamos as doses da neurotoxina e os animais utilizados nesses estudos, notamos que eles injetaram diferentes quantidades de 6-OHDA e usaram espécies animais distintas, 30 µg em ratos Sprague-Dawley (CHUANG *et al.*, 2017) e 8 µg em camundongos C57BL/6 (TUON *et al.*, 2015). A quantidade de neurotoxina injetada foi capaz de promover um dano maior no sistema dopaminérgico, por exemplo, os níveis de TH diminuíram cerca de 75% na SNc e os animais giraram aproximadamente 600 vezes mais que o controle no comportamento de rotação. Em nosso estudo, modulamos uma forma inicial de DP, o que poderia explicar por que apenas a SNc, uma estrutura mais vulnerável, foi afetada. Os neurônios da SNc possuem axônios altamente arborizados e, conseqüentemente, possuem muitos terminais axonais, que acabam por demandar mais energia e por isso apresentam maior quantidade de mitocôndrias (GIGUERE; BURKE NANNI; TRUDEAU, 2018). Essa alta demanda energética e mitocondrial favorece quadros de estresse oxidativo. Além disso, devido à alta taxa de arborização desses neurônios, as mitocôndrias ou quaisquer outras organelas e proteínas levam mais tempo para se deslocarem até o núcleo celular, o que também pode justificar um maior acúmulo de elementos disfuncionais nessa população (BURKE; O'MALLEY, 2013).

Sob este aspecto, o protocolo de treinamento em esteira aplicado neste estudo foi capaz de reverter a redução das proteínas envolvidas com função e biogênese mitocondrial na SNc. Três sessões de exercício, apesar da diferença encontrada entre as técnicas, demonstraram benefícios na expressão de PGC-1α e NRF-1. Já as doze sessões de treinamento foram capazes de promover a manutenção dos níveis proteicos de PGC-1α, NRF-1, TFAM e OXPHOS, além da expressão e atividade do complexo I. Diversos estudos corroboram com esses resultados ao demonstrarem que o exercício, no modelo 6-OHDA, reestabeleceu níveis proteicos dos complexos I-IV na SNc e CPu (30 min/dia, 15 m/min, 4 semanas) (CHUANG *et al.*, 2017) e restaurou atividade do complexo I no CPu e hipocampo (50 min, 3-4 x/semana, 8 semanas) (TUON *et al.*, 2015). Já no modelo MPTP o exercício restabeleceu os níveis de TFAM e NRF-1, a expressão dos complexos II e V, a densidade mitocondrial (60 min, 12m/min, 5x/semana, 6 semanas) (JANG *et al.*, 2018) e os níveis de COX I e IV na SN (60 min, 5x/semana,

8 semanas) (KOO; CHO; LEE, 2017), e melhorou a função mitocondrial no CPu (40 min, 5x/semana, 18 semanas) (LAU *et al.*, 2011).

Poucos trabalhos relataram a influência do exercício, em modelos da DP, após curto período de treinamento. Protocolos de exercício em esteira de 30 minutos/dia realizados por 9 (TILLERSON *et al.*, 2003), 14 (YOON *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2013; DA COSTA *et al.*, 2017) e 16 dias (CHOE *et al.*, 2012) são relatados na literatura. Esses estudos apontam o aumento na neurogênese hipocampal e nos níveis de fatores neurotróficos como BDNF, e a manutenção nos níveis de TH, de dopamina e do transportador de dopamina como decorrência do treinamento. Os resultados do presente estudo (manutenção dos níveis de PGC-1 α e NRF-1) sugerem que alguns benefícios do exercício físico já aparecem após uma semana de treinamento.

Com relação a atividade do complexo I, nossos resultados mostraram uma expressão proteica reduzida e uma atividade aumentada, indicando alterações na função do complexo I. Esse aumento da atividade pode indicar um mecanismo compensatório em resposta à sua expressão reduzida (HAVLÍČKOVÁ KARBANOVÁ *et al.*, 2012). No entanto, essas alterações não foram relacionadas à diminuição no conteúdo mitocondrial, visto que não houve alterações na expressão de VDAC. Estudos anteriores mostraram atividade do complexo I reduzida em diferentes regiões cerebrais de indivíduos com DP, como córtex pré-frontal, cerebelo e SN (SCHAPIRA *et al.*, 1990; GATT *et al.*, 2016; FLØNES *et al.*, 2018), o que contradiz nossos resultados. Entretanto, corroborando com nossos achados Foti *et al.* (2019) também demonstraram um aumento da atividade do complexo I usando amostras *post-mortem* da substância branca occipital de pacientes com DP. Nesse trabalho também foi encontrada uma redução na atividade dos complexos II/III (FOTI *et al.*, 2019). Diferentes métodos, tecidos e modelos utilizados para avaliar a atividade mitocondrial podem explicar esses resultados conflitantes, assim mais experimentos precisam ser realizados para sanar esses conflitos. Apesar disso, a disfunção mitocondrial na DP parece ser um fator comum entre todos os estudos. E além disso, nosso protocolo de exercício físico foi capaz de restaurar essa atividade alterada, destacando a importância terapêutica dessa ferramenta.

Em contrapartida, o grupo de animais que recebeu injeção de salina e foi submetido ao treinamento em esteira não apresentou alterações nos níveis das proteínas analisadas quando comparados ao controle, ao contrário do observado na

literatura. Steiner et al. (2011) demonstraram aumento da expressão gênica de PGC-1 α e SIRT1, assim como Lezi et al. (2014) também relatam aumento do nível proteico de PGC-1 α , ambos avaliaram diversas regiões cerebrais de animais envelhecidos submetidos ao exercício em esteira. Entretanto, esses trabalhos utilizaram de protocolos de treinamento mais intensivos, de oito semanas, 55 min por sessão, 2x/dia, 5x/semana (E; BURNS; SWERDLOW, 2014) e oito semanas, 60 min por sessão, 5x/semana (STEINER *et al.*, 2011), o que pode justificar os resultados encontrados no presente trabalho, tendo em vista que foi utilizado um protocolo de intensidade leve/moderada. Tomados em conjunto, um exercício mais intenso pode ser necessário para aumentar a expressão dos marcadores relacionados a biogênese mitocondrial em animais saudáveis, porém o protocolo utilizado nesses estudo foi suficiente para proteger os neurônios dos animais 6-OHDA+EX.

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, intervenções que atuam nessa via, como o exercício físico, parecem interferir na integridade mitocondrial, tornando-se uma alternativa interessante para as doenças que afetam essa organela. Outros estudos também demonstram benefícios ao utilizarem intervenções farmacológicas, corroborando o presente trabalho. Por exemplo, a ativação de PGC-1 α pelo MitoQ, um antioxidante que atua nas mitocôndrias, preveniu a morte neuronal dopaminérgica no modelo animal 6-OHDA (XI *et al.*, 2018). O resveratrol, um composto polifenólico que foi capaz de induzir o aumento do conteúdo proteico de PGC-1 α e TFAM em fibroblastos normais e em pacientes com DP (FERRETTA *et al.*, 2014), também se mostrou benéfico ao proteger contra a perda dopaminérgica e contra a diminuição de TH em um modelo de MPTP (GUO *et al.*, 2016). Também foi demonstrada a atenuação da disfunção mitocondrial e apoptose celular por resveratrol em um modelo *in vitro* da DP induzido por rotenona (WANG *et al.*, 2018). Contribuindo com essa literatura, nosso trabalho destaca a importância dessa via como possível alvo farmacológico.

Por fim, no presente trabalho pode-se observar que o exercício físico de intensidade leve/moderada em uma frequência baixa (três vezes por semana) mostra benefícios mitocondriais, pelo reestabelecimento dos níveis de PGC-1 α e NRF-1, em apenas uma semana de treinamento (três sessões). Esse resultado é intensificado após um mês (doze sessões), onde todos os fatores envolvidos com a função e biogênese mitocondrial avaliados também foram recuperados, além dos

comportamentos motores. Assim, esse estudo fornece novos conhecimentos para o estabelecimento de protocolos de exercício em esteira intermitente, que se aproximam mais da realidade do paciente com DP. Além disso, ensaios que demonstrem a eficácia do exercício após um curto período e seus efeitos otimizados com a continuação do treinamento, mostram-se imprescindíveis para incentivar esses indivíduos à prática de exercícios. E ainda, a função e biogênese mitocondrial se mostraram uma possível via terapêutica para a DP.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que um protocolo intermitente de exercício é capaz de proteger contra as alterações do sistema dopaminérgico, comportamento motor, biogênese mitocondrial e complexo I encontradas em modelo animal da DP induzido por 6-OHDA. Nossos dados também demonstraram que o protocolo do exercício físico previne progressivamente o comprometimento da função e da biogênese mitocondrial, podendo esse ser um possível mecanismo envolvido nos efeitos neuroprotetores dessa terapia na DP.

REFERÊNCIAS *

- AGUIAR, A. S., JR. et al. Moderate-Intensity Physical Exercise Protects Against Experimental 6-Hydroxydopamine-Induced Hemiparkinsonism Through Nrf2-Antioxidant Response Element Pathway. **Neurochem Res**, v. 41, n. 1-2, p. 64-72, Feb 2016. ISSN 0364-3190.
- ALVAREZ-FISCHER, D. et al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. **Exp Neurol**, v. 210, n. 1, p. 182-93, Mar 2008. ISSN 0014-4886
- ANDREYEV, A. Y. et al. Mitochondrial ROS Metabolism: 10 Years Later. **Biochemistry (Mosc)**, v. 80, n. 5, p. 517-31, May 2015. ISSN 0006-2979.
- AQUINO, C. C.; FOX, S. H. Clinical spectrum of levodopa-induced complications. **Mov Disord**, v. 30, n. 1, p. 80-9, Jan 2015. ISSN 0885-3185.
- ARIDA, R. M. et al. Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 90, n. 6, p. 452-65, Jun 2011. ISSN 0894-9115.
- ARKADIR, D.; BERGMAN, H.; FAHN, S. Redundant dopaminergic activity may enable compensatory axonal sprouting in Parkinson disease. **Neurology**, v. 82, n. 12, p. 1093-8, Mar 25 2014. ISSN 0028-3878.
- BINDA, K. H. et al. Antinociceptive effects of treadmill exercise in a rat model of Parkinson's disease: the role of cannabinoid and opioid receptors. **Brain Research**, p. 146521, 2019/11/04/ 2019. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000689931930575X> >.
- BOVOLENTA, T. M. et al. Average annual cost of Parkinson's disease in Sao Paulo, Brazil, with a focus on disease-related motor symptoms. **Clin Interv Aging**, v. 12, p. 2095-2108, 2017. ISSN 1176-9092.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697
- BURKE, R. E.; O'MALLEY, K. Axon degeneration in Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 246, p. 72-83, Aug 2013. ISSN 0014-4886.
- CAMILETTI-MOIRON, D. et al. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. **Scand J Med Sci Sports**, v. 23, n. 4, p. e202-12, Aug 2013. ISSN 0905-7188.
- CHATURVEDI, R. K.; FLINT BEAL, M. Mitochondrial diseases of the brain. **Free Radic Biol Med**, v. 63, p. 1-29, Oct 2013. ISSN 0891-5849.
- CHEN, P.-H. et al. Gait Disorders in Parkinson's Disease: Assessment and Management. **International Journal of Gerontology**, v. 7, 12/01 2013.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NRB 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.

CHO, H. S. et al. Treadmill exercise alleviates short-term memory impairment in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **J Exerc Rehabil**, v. 9, n. 3, p. 354-61, 2013. ISSN 2288-176X

CHOE, M. A. et al. Effects of Treadmill Exercise on the Recovery of Dopaminergic Neuron Loss and Muscle Atrophy in the 6-OHDA Lesioned Parkinson's Disease Rat Model. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 16, n. 5, p. 305-12, Oct 2012. ISSN 1226-4512.

CHUANG, C. S. et al. Modulation of mitochondrial dynamics by treadmill training to improve gait and mitochondrial deficiency in a rat model of Parkinson's disease. **Life Sci**, v. 191, p. 236-244, Dec 15 2017. ISSN 0024-3205.

COHEN, A. D.; ZIGMOND, M. J.; SMITH, A. D. Effects of intrastriatal GDNF on the response of dopamine neurons to 6-hydroxydopamine: time course of protection and neurorestoration. **Brain research**, v. 1370, p. 80-88, 2011. ISSN 1872-6240. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21062624>>.

CROWLEY, E. K.; NOLAN, Y. M.; SULLIVAN, A. M. Exercise as a therapeutic intervention for motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease: Evidence from rodent models. **Prog Neurobiol**, v. 172, p. 2-22, Jan 2019. ISSN 0301-0082.

DA COSTA, R. O. et al. The Treadmill Exercise Protects against Dopaminergic Neuron Loss and Brain Oxidative Stress in Parkinsonian Rats. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, p. 2138169, 2017. ISSN 1942-0994.

DEBALSI, K. L.; HOFF, K. E.; COPELAND, W. C. Role of the mitochondrial DNA replication machinery in mitochondrial DNA mutagenesis, aging and age-related diseases. **Ageing Res Rev**, v. 33, p. 89-104, Jan 2017. ISSN 1568-1637.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radic Biol Med**, v. 62, p. 132-144, Sep 2013. ISSN 0891-5849.

DUNNETT, S. B.; TORRES, E. M. Rotation in the 6-OHDA-Lesioned Rat. In: LANE, E. L. e DUNNETT, S. B. (Ed.). **Animal Models of Movement Disorders: Volume I**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. p.299-315. ISBN 978-1-61779-298-4.

E, L.; BURNS, J. M.; SWERDLOW, R. H. Effect of high-intensity exercise on aged mouse brain mitochondria, neurogenesis, and inflammation. **Neurobiol Aging**, v. 35, n. 11, p. 2574-2583, Nov 2014. ISSN 0197-4580.

ESCHBACH, J. et al. Mutual exacerbation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha deregulation and alpha-synuclein oligomerization. **Ann Neurol**, v. 77, n. 1, p. 15-32, Jan 2015. ISSN 0364-5134.

ESCHBACH, J. et al. Mutual exacerbation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α deregulation and α -synuclein oligomerization. **Ann Neurol**, v. 77, n. 1, p. 15-32, Jan 2015. ISSN 0364-5134

FELIX, J. V.; MICHELINI, L. C. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p. 780-5, Oct 2007. ISSN 0194-911x.

- FERRETTA, A. et al. Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familial Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 7, p. 902-15, Jul 2014. ISSN 0006-3002 (Print)
- FIORENZA, M. et al. Metabolic stress-dependent regulation of the mitochondrial biogenic molecular response to high-intensity exercise in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 596, n. 14, p. 2823-2840, Jul 2018. ISSN 0022-3751.
- FLØNES, I. H. et al. Neuronal complex I deficiency occurs throughout the Parkinson's disease brain, but is not associated with neurodegeneration or mitochondrial DNA damage. **Acta Neuropathologica**, v. 135, n. 3, p. 409-425, March 01 2018. ISSN 1432-0533. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1794-7> >.
- FONTANA, L. Modulating human aging and age-associated diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1790, n. 10, p. 1133-1138, 2009/10/01/2009. ISSN 0304-4165.
- FOTI, S. C. et al. Cerebral mitochondrial electron transport chain dysfunction in multiple system atrophy and Parkinson's disease. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6559, 2019/04/25 2019. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42902-7> >.
- GALLO, P. M.; GARBER, C. E. Parkinson's disease: a comprehensive approach to exercise prescription for the health fitness professional. **ACSM's Health & Fitness Journal**, v. 15, n. 4, p. 8-17, 2011. ISSN 1091-5397.
- GARCIA, P. C.; REAL, C. C.; BRITTO, L. R. The Impact of Short and Long-Term Exercise on the Expression of Arc and AMPARs During Evolution of the 6-Hydroxy-Dopamine Animal Model of Parkinson's Disease. **J Mol Neurosci**, v. 61, n. 4, p. 542-552, Apr 2017. ISSN 0895-8696.
- GATT, A. P. et al. Dementia in Parkinson's disease is associated with enhanced mitochondrial complex I deficiency. **Movement Disorders**, v. 31, n. 3, p. 352-359, 2016. ISSN 0885-3185. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mds.26513> >.
- GELDENHUYS, W. J. et al. A novel biomechanical analysis of gait changes in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **PeerJ**, v. 3, p. e1175, 2015.
- GHATAK, S. et al. Parkinson's disease: what the model systems have taught us so far. **J Genet**, v. 97, n. 3, p. 729-751, Jul 2018. ISSN 0022-1333.
- GIGUERE, N.; BURKE NANNI, S.; TRUDEAU, L. E. On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson's Disease. **Front Neurol**, v. 9, p. 455, 2018. ISSN 1664-2295
- GRABOWSKA, W.; SIKORA, E.; BIELAK-ZMIJEWSKA, A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. **Biogerontology**, v. 18, n. 4, p. 447-476, Aug 2017. ISSN 1389-5729.
- GRADARI, S. et al. Can Exercise Make You Smarter, Happier, and Have More Neurons? A Hormetic Perspective. **Front Neurosci**, v. 10, p. 93, 2016. ISSN 1662-4548
- GRUNEWALD, A.; KUMAR, K. R.; SUE, C. M. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 177, p. 73-93, Jun 2019. ISSN 0301-0082.

GRUNEWALD, A. et al. Mitochondrial DNA Depletion in Respiratory Chain-Deficient Parkinson Disease Neurons. **Ann Neurol**, v. 79, n. 3, p. 366-78, Mar 2016. ISSN 0364-5134.

GUO, Y. J. et al. Resveratrol alleviates MPTP-induced motor impairments and pathological changes by autophagic degradation of alpha-synuclein via SIRT1-deacetylated LC3. **Mol Nutr Food Res**, v. 60, n. 10, p. 2161-2175, Oct 2016. ISSN 1613-4125.

GUSDON, A. M. et al. Exercise increases mitochondrial complex I activity and DRP1 expression in the brains of aged mice. **Exp Gerontol**, v. 90, p. 1-13, Apr 2017. ISSN 0531-5565.

HAVLÍČKOVÁ KARBANOVÁ, V. et al. Compensatory upregulation of respiratory chain complexes III and IV in isolated deficiency of ATP synthase due to TMEM70 mutation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1817, n. 7, p. 1037-1043, 2012/07/01/ 2012. ISSN 0005-2728. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272812000795> >.

HEKIMI, S.; WANG, Y.; NOE, A. Mitochondrial ROS and the Effectors of the Intrinsic Apoptotic Pathway in Aging Cells: The Discerning Killers! **Front Genet**, v. 7, p. 161, 2016. ISSN 1664-8021.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; ZAVALA-FLORES, L. M.; VILLANUEVA-OLIVO, A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. **Neurología (English Edition)**, v. 32, n. 8, p. 533-539, 2017/10/01/ 2017. ISSN 2173-5808.

HOOD, D. A. et al. Exercise and the Regulation of Mitochondrial Turnover. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 135, p. 99-127, 2015. ISSN 1877-1173.

HOU, L. et al. Exercise-Induced Neuroprotection of the Nigrostriatal Dopamine System in Parkinson's Disease. **Front Aging Neurosci**, v. 9, p. 358, 2017. ISSN 1663-4365 (Print).

HSUEH, S. C. et al. Voluntary Physical Exercise Improves Subsequent Motor and Cognitive Impairments in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 2, Feb 8 2018. ISSN 1422-0067.

HUANG, C. C. et al. Effect of Exercise Training on Skeletal Muscle SIRT1 and PGC-1alpha Expression Levels in Rats of Different Age. **Int J Med Sci**, v. 13, n. 4, p. 260-70, 2016. ISSN 1449-1907.

JANG, Y. et al. Modulation of mitochondrial phenotypes by endurance exercise contributes to neuroprotection against a MPTP-induced animal model of PD. **Life Sci**, v. 209, p. 455-465, Sep 15 2018. ISSN 0024-3205.

JIANG, H. et al. Adult Conditional Knockout of PGC-1 α Leads to Loss of Dopamine Neurons. **eNeuro**, v. 3, n. 4, Jul-Aug 2016. ISSN 2373-2822.

JODEIRI FARSHBAF, M. et al. Does PGC1alpha/FNDC5/BDNF Elicit the Beneficial Effects of Exercise on Neurodegenerative Disorders? **Neuromolecular Med**, v. 18, n. 1, p. 1-15, Mar 2016. ISSN 1535-1084.

KAUSHAL, N. et al. Investigating dose-response effects of multimodal exercise programs on health-related quality of life in older adults. **Clin Interv Aging**, v. 14, p. 209-217, 2019. ISSN 1176-9092.

KIM, J. et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. **Exp Mol Med**, v. 48, p. e224, Apr 1 2016. ISSN 1226-3613.

KONNOVA, E. A.; SWANBERG, M. **Animal Models of Parkinson's Disease**. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects. Brisbane (AU): Codon Publications: 83-106 p. 2018.

KOO, J. H.; CHO, J. Y.; LEE, U. B. Treadmill exercise alleviates motor deficits and improves mitochondrial import machinery in an MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. **Exp Gerontol**, v. 89, p. 20-29, Mar 2017. ISSN 0531-5565.

KOULI, A.; TORSNEY, K. M.; KUAN, W. L. **Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis**. Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects [Internet]. STOKER, T. B. e GREENLAND, J. C. Brisbane (AU): Codon Publications 2018.

KUTER, K. et al. Adaptation within mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and membrane viscosity during degeneration of dopaminergic neurons in an animal model of early Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1862, n. 4, p. 741-753, Apr 2016. ISSN 0006-3002

KWOK, J. Y.; CHOI, K. C.; CHAN, H. Y. Effects of mind-body exercises on the physiological and psychosocial well-being of individuals with Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Complement Ther Med**, v. 29, p. 121-131, Dec 2016. ISSN 0965-2299.

LANGSTON, J. W. et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 979-80, Feb 25 1983. ISSN 0036-8075

LAU, Y. S. et al. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. **Eur J Neurosci**, v. 33, n. 7, p. 1264-74, Apr 2011. ISSN 0953-816x.

LEANDRO, C. G. et al. A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. **J Strength Cond Res**, v. 21, n. 3, p. 751-6, Aug 2007. ISSN 1064-8011 (Print).

LEASURE, J. L.; JONES, M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. **Neuroscience**, v. 156, n. 3, p. 456-65, Oct 15 2008. ISSN 0306-4522.

LEE, C. S. et al. In vivo positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic dopaminergic nerve terminals in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 47, n. 4, p. 493-503, Apr 2000. ISSN 0364-5134.

LEWITT, P. A. Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Mov Disord**, v. 30, n. 1, p. 64-72, Jan 2015. ISSN 0885-3185.

LIU, H. W.; CHANG, S. J. Moderate Exercise Suppresses NF- κ B Signaling and Activates the SIRT1-AMPK-PGC1 α Axis to Attenuate Muscle Loss in Diabetic db/db Mice. **Front Physiol**, v. 9, p. 636, 2018. ISSN 1664-042X.

MACDONALD, R. et al. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? **Biochem Soc Trans**, v. 46, n. 4, p. 891-909, Aug 20 2018. ISSN 0300-5127.

MAILLOUX, R. J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. **Redox Biol**, v. 4, p. 381-98, 2015. ISSN 2213-2317.

MCEWEN, B. S. The ever-changing brain: cellular and molecular mechanisms for the effects of stressful experiences. **Dev Neurobiol**, v. 72, n. 6, p. 878-90, Jun 2012. ISSN 1932-8451.

MEI, D. et al. Progression of Behavioral and CNS Deficits in a Viable Murine Model of Chronic Neuronopathic Gaucher Disease. **PLoS One**, v. 11, p. e0162367, 2016.

MENZIES, P. et al. Blood lactate clearance during active recovery after an intense running bout depends on the intensity of the active recovery. **J Sports Sci**, v. 28, n. 9, p. 975-82, Jul 2010. ISSN 0264-0414.

MERGHANI, A.; MALHOTRA, A.; SHARMA, S. The U-shaped relationship between exercise and cardiac morbidity. **Trends Cardiovasc Med**, v. 26, n. 3, p. 232-40, Apr 2016. ISSN 1050-1738.

MORTIBOYS, H. et al. Translational approaches to restoring mitochondrial function in Parkinson's disease. **FEBS Lett**, v. 592, n. 5, p. 776-792, Mar 2018. ISSN 0014-5793.

MUDO, G. et al. Transgenic expression and activation of PGC-1alpha protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, n. 7, p. 1153-65, Apr 2012. ISSN 1420-682x.

NOKIA, M. S. et al. Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. **J Physiol**, v. 594, n. 7, p. 1855-73, Apr 1 2016. ISSN 0022-3751.

OLIVEIRA, B. R.; DESLANDES, A. C.; SANTOS, T. M. Differences in exercise intensity seems to influence the affective responses in self-selected and imposed exercise: a meta-analysis. **Front Psychol**, v. 6, p. 1105, 2015. ISSN 1664-1078

OLIVEIRA DE CARVALHO, A. et al. Physical Exercise For Parkinson's Disease: Clinical And Experimental Evidence. **Clinical practice and epidemiology in mental health : CP & EMH**, v. 14, p. 89-98, 2018. ISSN 1745-0179.

OTERA, H.; MIHARA, K. Mitochondrial Dynamics: Functional Link with Apoptosis. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, p. 10, 2012.

PALIKARAS, K. et al. Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. **Pharmacol Ther**, v. 178, p. 157-174, Oct 2017. ISSN 0163-7258.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. **Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates**. Academic press, 2019. ISBN 0128161582.

PENG, K. et al. The Interaction of Mitochondrial Biogenesis and Fission/Fusion Mediated by PGC-1alpha Regulates Rotenone-Induced Dopaminergic Neurotoxicity. **Mol Neurobiol**, v. 54, n. 5, p. 3783-3797, Jul 2017. ISSN 0893-7648.

PERROTIN, S. et al. A multimodal and multidisciplinary program to prevent loss of mobility in patients aged over 70 years: study protocol of a multicenter cluster randomized study in primary care (the PRISME-3P study). **BMC Geriatrics**, v. 19, n. 1, p. 48, 2019/02/19 2019. ISSN 1471-2318.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1alpha gene in human skeletal muscle. **J Physiol**, v. 546, n. Pt 3, p. 851-8, Feb 1 2003. ISSN 0022-3751.

PRINGSHEIM, T. et al. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord**, v. 29, n. 13, p. 1583-90, Nov 2014. ISSN 0885-3185.

PROCACCIO, V. et al. Perspectives of drug-based neuroprotection targeting mitochondria. **Rev Neurol (Paris)**, v. 170, n. 5, p. 390-400, May 2014. ISSN 0035-3787

RAFFERTY, M. R. et al. Effects of 2 years of exercise on gait impairment in people with Parkinson Disease: The PRET-PD randomized trial. **Journal of Neurologic Physical Therapy**, v. 41, n. 1, p. 21-30, 2017.

REAL, C. C. et al. BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 237, p. 118-29, May 1 2013. ISSN 0306-4522.

REAL, C. C.; GARCIA, P. C.; BRITTO, L. R. G. Treadmill Exercise Prevents Increase of Neuroinflammation Markers Involved in the Dopaminergic Damage of the 6-OHDA Parkinson's Disease Model. **J Mol Neurosci**, v. 63, n. 1, p. 36-49, Sep 2017. ISSN 0895-8696.

ROBINSON, T. E.; CASTANEDA, E.; WHISHAW, I. Q. Compensatory changes in striatal dopamine neurons following recovery from injury induced by 6-OHDA or methamphetamine: a review of evidence from microdialysis studies. **Can J Psychol**, v. 44, n. 2, p. 253-75, Jun 1990. ISSN 0008-4255

ROMERO-GARCIA, S.; PRADO-GARCIA, H. Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review). **Int J Oncol**, v. 54, n. 4, p. 1155-1167, Apr 2019. ISSN 1019-6439.

ROSTOSKY, C. M.; MILOSEVIC, I. Gait Analysis of Age-dependent Motor Impairments in Mice with Neurodegeneration. **J Vis Exp**, n. 136, Jun 18 2018. ISSN 1940-087x.

SCARPULLA, R. C. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. **Physiol Rev**, v. 88, n. 2, p. 611-38, Apr 2008. ISSN 0031-9333

SCHAPIRA, A. H. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 54, n. 3, p. 823-7, Mar 1990. ISSN 0022-3042.

SHERRINGTON, C. et al. Exercise for preventing falls in older people living in the community. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2019, 01/31 2019.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-Hydroxydopamine model of parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 11, n. 3, p. 151-167, September 01 2007. ISSN 1476-3524.

SONG, D. D.; HABER, S. N. Striatal responses to partial dopaminergic lesion: evidence for compensatory sprouting. **J Neurosci**, v. 20, n. 13, p. 5102-14, Jul 1 2000. ISSN 0270-6474.

SPINAZZI, M. et al. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. **Nat Protoc**, v. 7, n. 6, p. 1235-46, May 31 2012. ISSN 1750-2799.

- ST-PIERRE, J. et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 397-408, Oct 20 2006. ISSN 0092-8674
- STEINER, J. L. et al. Exercise training increases mitochondrial biogenesis in the brain. **J Appl Physiol (1985)**, v. 111, n. 4, p. 1066-71, Oct 2011. ISSN 0161-7567.
- STOTT, S. R.; BARKER, R. A. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 39, n. 6, p. 1042-56, Mar 2014. ISSN 0953-816x.
- SVEINBJORNSDOTTIR, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 139 Suppl 1, p. 318-324, Oct 2016. ISSN 0022-3042.
- TANAKA, T. et al. Mitochondrial dynamics in exercise physiology. **Pflugers Arch**, Feb 1 2019. ISSN 0031-6768.
- THOMAS, R. R. et al. RhtFAM treatment stimulates mitochondrial oxidative metabolism and improves memory in aged mice. **Aging (Albany NY)**, v. 4, n. 9, p. 620-35, Sep 2012. ISSN 1945-4589.
- TILLERSON, J. L. et al. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 899-911, 2003. ISSN 0306-4522
- TILOKANI, L. et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. **Essays Biochem**, v. 62, n. 3, p. 341-360, Jul 20 2018. ISSN 0071-1365.
- TRAN, T. N. et al. Levodopa-induced dyskinesia: clinical features, incidence, and risk factors. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 125, n. 8, p. 1109-1117, Aug 2018. ISSN 0300-9564.
- TUON, T. et al. Physical Training Regulates Mitochondrial Parameters and Neuroinflammatory Mechanisms in an Experimental Model of Parkinson's Disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 261809, 2015. ISSN 1942-0994.
- TYSNES, O.-B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 901-905, August 01 2017. ISSN 1435-1463.
- UNDESA. World Population Prospects 2019. **Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat** 2019. Disponível em: <<https://population.un.org/wpp/>> .
- UNGERSTEDT, U. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 107-110, 1968/12/01/ 1968. ISSN 0014-2999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014299968901647>> .
- VAN DER BLIEK, A. M.; SEDENSKY, M. M.; MORGAN, P. G. Cell Biology of the Mitochondrion. **Genetics**, v. 207, n. 3, p. 843-871, Nov 2017. ISSN 0016-6731.
- VAN HOOREN, B.; PEAKE, J. M. Do We Need a Cool-Down After Exercise? A Narrative Review of the Psychophysiological Effects and the Effects on Performance, Injuries and the Long-Term Adaptive Response. **Sports Med**, v. 48, n. 7, p. 1575-1595, Jul 2018. ISSN 0112-1642.

VUCKOVIC, M. G. et al. Exercise elevates dopamine D2 receptor in a mouse model of Parkinson's disease: in vivo imaging with [(1)(8)F]fallypride. **Mov Disord**, v. 25, n. 16, p. 2777-84, Dec 15 2010. ISSN 0885-3185.

WANG, H. et al. Resveratrol Suppresses Rotenone-induced Neurotoxicity Through Activation of SIRT1/Akt1 Signaling Pathway. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 301, n. 6, p. 1115-1125, Jun 2018. ISSN 1932-8486.

WANG, S. et al. Efficacy of different types of exercises on global cognition in adults with mild cognitive impairment: a network meta-analysis. **Ageing Clin Exp Res**, v. 31, n. 10, p. 1391-1400, Oct 2019. ISSN 1594-0667.

WHO. Neurological Disorders: Public Health Challenges. **WORLD HEALTHY ORGANIZATION** Geneva, p. 232, 2006. Disponível em: < http://www.who.int/mental_health/publications/neurological_disorders_ph_challenges/en/ >.

WILSON, D. F. Oxidative phosphorylation: regulation and role in cellular and tissue metabolism. **J Physiol**, v. 595, n. 23, p. 7023-7038, Dec 1 2017. ISSN 0022-3751.

XI, Y. et al. MitoQ protects dopaminergic neurons in a 6-OHDA induced PD model by enhancing Mfn2-dependent mitochondrial fusion via activation of PGC-1alpha. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1864, n. 9 Pt B, p. 2859-2870, Sep 2018. ISSN 0925-4439

XU, Q. et al. Physical activities and future risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 75, n. 4, p. 341-8, Jul 27 2010. ISSN 0028-3878.

YOON, M. C. et al. Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Neurosci Lett**, v. 423, n. 1, p. 12-7, Aug 9 2007. ISSN 0304-3940

ZHENG, B. et al. PGC-1alpha, a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. **Sci Transl Med**, v. 2, n. 52, p. 52ra73, Oct 6 2010. ISSN 1946-6234.