

Universidade Federal de Minas Gerais

Janine Costa Ivo

Alterações comportamentais e de músculo esquelético em modelo experimental da doença de Parkinson: efeito do treinamento em esteira.

Belo Horizonte

2014

Janine Costa Ivo

**Alterações comportamentais e de músculo esquelético em
modelo experimental da doença de Parkinson: efeito do
treinamento em esteira.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Prof^ª. Elizabeth Ribeiro da Silva

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte

2014



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

JANINE COSTA IVO

255/2014/10
entrada
1º/2012
2012665041

Às **quatorze horas** do dia **28 de abril de 2014**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**Alterações comportamentais e de músculo esquelético em modelo experimental da doença de Parkinson: efeito do treinamento em esteira**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Elizabeth Ribeiro da Silva**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

| Prof./Pesq. | Instituição | Indicação |
|--------------------------------|-------------|-----------------|
| Dra Elizabeth Ribeiro da Silva | UFMG | <i>Aprovada</i> |
| Dr. Anderson José Ferreira | UFMG | <i>APROVADA</i> |
| Dra. Paula Luciana Scalzo | UFMG | <i>APROVADA</i> |

Pelas indicações, a candidata foi considerada: *APROVADA*

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 28 de abril de 2014.**

Dra. Elizabeth Ribeiro da Silva (Orientadora) *Elizabeth Ribeiro da Silva*

Dr. Anderson José Ferreira *Anderson José Ferreira*

Dra. Paula Luciana Scalzo *Paula Luciana Scalzo*

Cleida

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Cleida Aparecida de Oliveira
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

Dissertação realizada no Laboratório Prof^ª. Conceição Machado, do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob a orientação da Prof^ª. Elizabeth Ribeiro da Silva com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Dedico este trabalho ao meu marido, Guilherme, e aos meus pais, Carlos e Terezinha, pelo apoio e amor incondicionais e por compreenderem minha ausência.

Agradecimentos

Agradeço à minha família pelo apoio, carinho e paciência durante o tempo de execução deste trabalho;

Aos grandes amigos Marco Antônio e Patrícia Mitre simplesmente por existirem em minha vida e assim torná-la mais leve e especial;

Ao Kinulpe Honorato e à Vanessa Freitas, pela imensa ajuda, pela amizade, carinho e pelas longas conversas que me deram força durante o tempo de execução do trabalho;

Aos colegas do laboratório Prof^ª.Conceição Machado: Patrícia, Érica, Rose, Maísa, Reinaldo, Renan, Bruna, Sara e Matheus, pela ótima convivência, carinho e auxílio em vários momentos;

Ao Carlos Henrique, técnico do laboratório, pela disposição em ajudar sempre e por compreender minhas limitações;

A todos os colegas do Centro de Microscopia – UFMG, pelo apoio e compreensão;

À Professora Elizabeth Ribeiro, pelo incentivo, paciência e por compreender minhas limitações enquanto servidora e aluna nesses dois anos;

À Professora Patrícia Massara, pela sensibilidade e auxílio em vários momentos importantes da execução do projeto;

À Professora Paula Scalzo, pela ajuda e paciência;

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, pela oportunidade e por abrir as portas oficialmente aos servidores desta Universidade, através do Programa de Qualificação dos Servidores técnico-administrativos em educação –Pós-Tae – permitindo-nos adquirir mais conhecimento para execução das nossas funções.

“No real da vida, as coisas acabam com menos
formato, nem acabam. Melhor assim. Pelejar pelo
exato dá erro contra a gente. “

(Personagem **Riobaldo**, Livro Grande Sertão:
Veredas, Guimarães Rosa)

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em humanos. Sua etiologia envolve fatores ambientais e genéticos desencadeando morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra, um núcleo associado ao controle da motricidade, o que resulta nos sintomas motores da doença. Na rotina clínica, intervenções com exercício físico mostram-se eficazes em promover melhora geral na condição física de pacientes, além de gerar benefícios ao cérebro. Estudos indicam que o músculo esquelético pode ser o principal mediador dos efeitos benéficos do exercício regular uma vez que a contração muscular interfere em vias de sinalização que regulam mudanças metabólicas e fenotípicas, bem como a produção de interleucinas e fatores neurotróficos. Este trabalho teve como objetivo investigar a existência de alterações no comportamento motor, nos níveis séricos e musculares de fatores neurotróficos e na ultraestrutura muscular, em modelo experimental da fase pré-clínica da doença de Parkinson por infusão intranasal de MPTP em ratos *Holtzman* (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), e avaliar o efeito do treinamento em esteira sobre essas alterações. Para análise do comportamento motor foram utilizados os testes de impressão de pata e campo aberto. Os animais exercitados em esteira apresentaram aumento significativo dos comprimentos do passo e passada, bem como da curiosidade exploratória, quando comparados aos animais sedentários. A condição motora não foi afetada pelo MPTP. Os animais treinados apresentaram redução nos níveis séricos de BDNF, mas não de GDNF. A neurotoxina provocou redução nos níveis de BDNF no soro e músculo sóleo de animais sedentários, mas não de animais treinados, enquanto os níveis de GDNF não foram alterados. Análises morfométricas em imagens de músculo sóleo, obtidas por microscopia eletrônica de transmissão, revelaram que o exercício foi capaz de promover aumento na porcentagem relativa de perfis mitocondriais e tríades, e redução na porcentagem de perfis mitocondriais com alterações estruturais. Na presença do MPTP, no entanto, houve maior ocorrência de mitocôndrias alteradas, tanto nos animais sedentários quanto nos animais treinados, indicando que o exercício não evitou alterações ultraestruturais no músculo sóleo. A infusão de MPTP também resultou em aumento de percentual de miofibrilas e diminuição de tríades, nos animais treinados. Este é o primeiro trabalho que demonstra alterações em músculo esquelético que antecedem o surgimento de sintomas motores em modelo animal para doença de Parkinson. Os resultados fornecem boas perspectivas para estudos posteriores com intuito de determinar a contribuição das estruturas associadas ao músculo na progressão dos sintomas motores na doença.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, MPTP, exercício físico, músculo esquelético, ultraestrutura, fatores neurotróficos.

ABSTRACT

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease in humans. Its etiology involves genetic and environmental factors triggering death of dopaminergic neurons in the substantia nigra, a nucleus associated with the control of movement, which results in motor symptoms of the disease. In clinical routine, exercise interventions have proven effective in promoting overall improvement in the physical condition of patients, and generate benefits to the brain. Studies indicate that skeletal muscle can be the primary mediator of the beneficial effects of regular exercise, since muscle contraction interfere with signaling pathways which regulate the metabolic and phenotypic changes, as well as the production of neurotrophic factors and interleukins. This study aimed to investigate whether changes in motor behavior, serum and muscle levels of neurotrophic factors and muscle ultrastructure in an experimental model of pre-clinic stage Parkinson's disease by intranasal infusion of MPTP in Holtzman (1 mice - methyl - 4 - phenyl - 1,2,3,6 - tetrahydropyridine), and evaluate the effect of treadmill training on these changes. For analysis of motor behavior, tests paw print and open field were used. The animals exercised on a treadmill showed a significant increase of the step lengths and passed as well as the exploratory curiosity, when compared to the sedentary animals. The driving condition was not affected by MPTP. The trained animals showed a reduction in serum levels of BDNF but not GDNF. The neurotoxin caused a reduction in BDNF levels in serum and soleus muscle of sedentary animals, but not in trained animals, while levels of GDNF were not changed. Morphometric analysis in images of soleus muscle, obtained by transmission electron microscopy, revealed that exercise was able to promote an increase in the relative percentage of mitochondrial profiles and triads, and reduction in the percentage of mitochondrial profiles with structural changes. In the presence of MPTP, however, there was a higher incidence of altered mitochondria, both in sedentary animals as in trained animals, indicating that exercise did not prevent ultrastructural alterations in the soleus muscle. Infusion of MPTP also resulted in increased percentage of myofibrils and decreased percentage of triads in trained animals. This is the first study that demonstrates changes in skeletal muscle that precede the onset of motor symptoms in animal model for Parkinson's disease. The results provide good prospects for further studies designed to determine the contribution of muscle structures associated with the progression of motor symptoms in the disease.

Keywords: Parkinson's Disease, MPTP, physical exercise, skeletal muscle, ultrastructure, neurotrophic factors.

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA – 6-Hidroxidopamina

BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor* (Fator neurotrófico derivado do cérebro)

BHE – Barreira hemato-encefálica

BMP's – *Bone morphogenetic proteins* (Proteínas morfogenéticas ósseas)

DA - Dopamina

DAT – *Dopamine transporter* (Transportador de dopamina)

DP - Doença de Parkinson

FCE – Fluido cérebro-espinhal

GDNF – *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (Fator neurotrófico derivado de glia)

GPe – *Globus Pallidus externus* (Globo Pálido externo)

GPi – *Globus Pallidus internus* (Globo Pálido interno)

IL's – Interleucinas

LIF – *Leukemia Inhibitory Fator* (Fator inibidor de leucemia)

MAO-B – Monoamina oxidase B

MPTP - *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine* (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina)

NO – *Nitric oxide* (Óxido Nítrico)

ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)

SN – *Substantia nigra* (substância negra)

SNC – Sistema nervoso central

SNpc – *Substantia Nigra pars compacta* (Substância negra parte compacta)

SNr – *Substantia Nigra pars reticulata* (Substância negra parte reticulada)

STN – *Subthalamic nucleus* (Núcleo subtalâmico)

TRD – Terapia de reposição de dopamina

TrKB – *Tyrosine kinase B receptor* (Receptor tirosina quinase B)

VMAT2 – *Vesicular monoamine transporter 2* (Transportador vesicular de monoamina 2)

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Representação dos grupos experimentais. | 27 |
| Figura 2: Delineamento experimental para os ratos do grupo sedentários..... | 29 |
| Figura 3: Delineamento experimental para os ratos submetidos a treinamento moderado em esteira (grupo corrida). | 30 |
| Figura 4: Representação esquemática das pegadas registradas pelo teste de impressão de pata e dos parâmetros avaliados..... | 32 |
| Figura 5: Peso corporal dos animais em gramas. | 38 |
| Figura 6: Avaliação de desempenho em esteira. | 38 |
| Figura 7: Avaliação de desempenho físico em esteira realizada no 8 ^o e no 23 ^o dia após a infusão intranasal de salina ou de MPTP. | 40 |
| Figura 8: O exercício regular aumenta o comprimento do passo e da passada (patas traseiras) dos animais..... | 40 |
| Figura 9: Parâmetros analisados pelo teste de impressão das patas traseiras..... | 41 |
| Figura 10: Exercício promoveu aumento do comportamento de <i>rearing</i> | 42 |
| Figura 11: Número e duração de <i>rearings</i> aos 21 e 30 dias (T3 e T4) após infusão intranasal de salina/MPTP | 43 |
| Figura 12: Número e duração de <i>grooming</i> aos 21 e 30 dias (T3 e T4) após infusão intranasal de salina/MPTP .. | 44 |
| Figura 13: Distância total percorrida (cm). | 45 |
| Figura 14: Tempo que os animais permaneceram no centro da arena..... | 45 |
| Figura 15: Velocidade média (m/min). | 45 |
| Figura 16: Efeito do exercício em esteira sobre os níveis de BDNF no soro(A) e músculos sóleo (B) e tibial (C)..... | 46 |
| Figura 17: Efeito do exercício em esteira sobre os níveis de GDNF no soro (A) e músculo tibial (B). | 47 |
| Figura 18: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre os níveis séricos de BDNF. | 47 |
| Figura 19: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre os níveis de BDNF no músculo sóleo. | 47 |
| Figura 20: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre os níveis de BDNF no músculo tibial.. | 47 |
| Figura 21: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre os níveis séricos e musculares de GDNF..... | 47 |
| Figura 22: Efeito do exercício em esteira sobre a porcentagem relativa de perfis mitocondriais..... | 49 |
| Figura 23: Efeito do exercício sobre a estrutura dos perfis mitocondriais de músculo..... | 49 |
| Figura 24: Efeito da infusão de MPTP sobre a porcentagem relativa de perfis mitocondriais..... | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 25: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre a estrutura dos perfis mitocondriais. | 50 |
| Figura 26: Ultramicrografias das principais alterações mitocondriais visualizadas ao microscópio eletrônico de transmissão. | 51 |
| Figura 27: Efeito do exercício sobre a porcentagem relativa de miofibrilas. | 52 |
| Figura 28: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre a porcentagem relativa de miofibrilas. | 52 |
| Figura 29: Efeito do exercício em esteira sobre a porcentagem relativa de tríades. | 53 |
| Figura 30: Efeito da infusão intranasal sobre a porcentagem relativa de tríades. | 53 |
| Figura 31: Efeito do exercício em esteira sobre a porcentagem relativa de sarcoplasma. | 54 |
| Figura 32: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre a porcentagem relativa de sarcoplasma. | 54 |
| Figura 33: Ultramicrografias de músculo sóleo. Animais sedentários salina. | 56 |
| Figura 34: Ultramicrografias de músculo sóleo. Animais sedentários MPTP. | 57 |
| Figura 35: Ultramicrografias de músculo sóleo. Animais treinados submetidos à infusão de salina. | 57 |
| Figura 36: Ultramicrografias de músculo sóleo. Animais treinados submetidos à infusão de MPTP. | 56 |

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| Resumo | vi |
| Abstract..... | ix |
| Lista de abreviaturas | vii |
| Lista de figuras | viii |
| Sumário..... | xiii |
| 1 Introdução e Justificativa..... | 16 |
| 1.1 Doença de Parkinson – Aspectos gerais | 16 |
| 1.2 Exercício Físico e Doença de Parkinson | 19 |
| 1.3 Músculo esquelético | 20 |
| 1.4 Modelo experimental por administração de MPTP..... | 21 |
| 2 Objetivos..... | 26 |
| 2.1 Objetivo geral | 26 |
| 2.1 Objetivos específicos..... | 26 |
| 3 Materiais e Métodos | 28 |
| 3.1 Animais | 28 |
| 3.2 Aclimação, avaliação de desempenho e treinamento em esteira..... | 30 |
| 3.3 Testes comportamentais..... | 31 |
| 3.3.1 Teste de impressão de pata..... | 31 |
| 3.3.2 Teste de campo aberto..... | 32 |
| 3.4 Infusão intranasal de salina e MPTP | 33 |
| 3.5 Eutanásia e coleta de material..... | 33 |
| 3.6 ELISA | 34 |
| 3.7 Microscopia eletrônica de transmissão | 35 |
| 3.7.1 Processamento das amostras | 35 |
| 3.7.2 Aquisição e análise de imagens..... | 36 |
| 3.8 Análise estatística | 36 |
| 4 Resultados..... | 38 |
| 4.1 Ganho de peso corporal | 38 |
| 4.2 Desempenho físico na esteira | 39 |
| 4.2.1 Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre o desempenho físico na esteira..... | 39 |

| | |
|---|----|
| 4.3 Efeito do exercício em esteira sobre o comportamento em teste de impressão de pata..... | 40 |
| 4.4 Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre o comportamento em teste de impressão de pata..... | 41 |
| 4.5 Efeito do exercício em esteira sobre o comportamento em teste de campo aberto | 42 |
| 4.6 Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre o comportamento em teste de campo aberto..... | 42 |
| 4.7 Níveis séricos e musculares de fatores neurotróficos | 46 |
| 4.7.1 Efeito do exercício em esteira | 46 |
| 4.7.2 Efeito da infusão intranasal de MPTP | 47 |
| 4.8 Microscopia eletrônica de transmissão | 49 |
| 4.8.1 Perfil de mitocôndrias no músculo sóleo | 49 |
| 4.8.2 Perfil de miofibrilas..... | 52 |
| 4.8.3 Tríades (Túbulos T e retículo sarcoplasmático)..... | 53 |
| 4.8.4 Sarcoplasma | 54 |
| 4.8.5 Outros (vasos, núcleos, células satélite, lipídio) | 55 |
| 4.8.6 Imagens do músculo sóleo obtidas em microscopia eletrônica de transmissão..... | 55 |
| 5 Discussão..... | 61 |
| 5.1 Condição física e motora dos animais..... | 61 |
| 5.2 Níveis de fatores neurotróficos | 63 |
| 5.3 Ultraestrutura muscular | 66 |
| 6 Conclusões e perspectivas | 72 |
| 7 Referências bibliográficas | 75 |
| Apêndice A – Peso corporal e velocidade máxima na avaliação de desempenho: Valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP)..... | 85 |
| Apêndice B – Parâmetros avaliados no teste de impressão da pata: Valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP)..... | 86 |
| Apêndice C – Parâmetros avaliados no teste de campo aberto: Valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP)..... | 88 |
| Apêndice D – Níveis de Fatores neurotróficos: Valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) | 90 |
| Apêndice E – Microscopia eletrônica de transmissão: Valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP)..... | 91 |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Doença de Parkinson – Aspectos gerais

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em humanos, depois da doença de Alzheimer. Afeta cerca de 1% das pessoas acima de 65 anos de idade, com maior prevalência em homens, e geralmente se manifesta na quinta ou sexta década de vida. Essa doença desenvolve-se em vários estágios de debilitação progressiva e, até o momento, não tem cura conhecida. Sua caracterização clínica baseia-se em sinais de comprometimento motor, sendo quatro os sinais cardinais da doença: tremor em repouso, rigidez muscular, instabilidade postural e bradicinesia. Sintomas não motores como disfunções autonômicas, distúrbios do sono, sintomas psiquiátricos e déficits cognitivos (BLANDINI, 2013) são também observados nos pacientes e podem ser tão desafiadores quanto os sintomas motores. A expressão de todos eles, no entanto, pode variar enormemente entre os pacientes, tornando-a uma desordem surpreendentemente heterogênea (BAZZU *et al.*, 2010).

A principal característica patológica da doença é a morte seletiva de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra (SNpc) que, funcionalmente, integra os núcleos da base juntamente com o estriado, globo pálido e núcleo subtalâmico. A degeneração da SNpc, que resulta em redução significativa do conteúdo de dopamina (DA) no estriado, é responsável pelo desequilíbrio dos sistemas envolvidos no controle e execução de movimentos voluntários. Os sintomas motores, no entanto, só se tornam aparentes quando se alcança 70-80% de morte neuronal, o que contribui para o diagnóstico clínico tardio da doença. A ocorrência de sintomas não motores indica o envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores tais como noradrenérgicos, serotoninérgicos e colinérgicos (BAZZU *et al.*, 2010), e também de sítios extranigrais, entre os quais, o giro cingulado anterior do córtex cerebral, a amígdala, o núcleo basal de Meynert, os neurônios do tálamo, do hipotálamo, o bulbo olfatório, os neurônios ganglionares simpáticos e a medula espinhal (BANIK, 2012).

O processo neuropatológico também é marcado pela presença de inclusões citoplasmáticas de agregados de alfa-sinucleína - denominados Corpos de Lewy - nos corpos celulares dos neurônios envolvidos. Os primeiros sinais de depósitos de alfa-sinucleína são encontrados em estruturas olfatórias anteriores e núcleo motor dorsal do nervo vago (estágio

1), alcançando núcleos do tronco encefálico, núcleo da rafe no estágio 2, e avança de modo ascendente pelo sistema nervoso central nos estágios seguintes - 3, 4, 5 e 6 – completando seu padrão de distribuição topográfica. A substância negra é atingida no estágio 3 e a doença atinge sua fase sintomática a partir do estágio 4. Há indícios, portanto, que o aparecimento dos Corpos de Lewy em diferentes regiões cerebrais parece estar relacionado aos estágios progressivos da doença (BRAAK *et al.*, 2006; BURKE, 2010).

A terapia de reposição de dopamina (TRD) com precursores ou agonistas do neurotransmissor é o tratamento mais utilizado na rotina clínica. Seus efeitos benéficos, no entanto, são restritos ao controle de sintomas motores e não impede ou retarda o processo de morte neuronal. Além disso, os demais sintomas, resultantes do envolvimento de sistemas não dopaminérgicos, não respondem à medicação e constituem o maior desafio na gestão clínica da doença (CASTRO *et al.*, 2012). A utilização da TRD gera efeitos colaterais, à medida que a doença progride, tais como desenvolvimento de movimentos involuntários anormais (discinesias), psicoses e distúrbios comportamentais (CASA-FAGES *et al.*, 2011), e sua utilização, portanto, é paliativa (OBESO *et al.*, 2008; PREDIGER *et al.*, 2010; AYTUN *et al.*, 2013).

A etiologia da DP é multifatorial e abrange fatores genéticos e ambientais, mas a contribuição relativa de cada fator para iniciar o processo neurodegenerativo não está esclarecida, apesar de décadas de extensiva investigação (BLANDINI, 2013). Vários estudos com modelos experimentais demonstram a participação de estresse oxidativo (SANDERS & GREENAMYRE, 2013), disfunção mitocondrial (JOHNSON *et al.*, 2010; DUPUIS, 2013; SCHAPIRA & GEGG, 2011), processamento aberrante de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma (COOK *et al.*, 2012; DEHAY *et al.*, 2013), inflamação (BLANDINI, 2013; LIU & HONG, 2003; REALE *et al.*, 2009), ativação de vias apoptóticas (ZHANG *et al.*, 2013), diminuição da função vesicular (ALTER *et al.*, 2013), oxidação de dopamina (BAZZU *et al.*, 2010) e excitotoxicidade (JOHNSON *et al.*, 2010).

Os casos de doença de Parkinson familiar, embora correspondam a apenas 10-15% dos casos, refletem-se na produção de proteínas mutantes e por este motivo contribuem para o entendimento de alguns dos mecanismos envolvidos na patogênese da doença. As proteínas envolvidas são essencialmente associadas à função mitocondrial, sendo as mais estudadas a Parkina, PINK1 e alfa-sinucleína. PINK 1 e Parkina, em particular, exercem função central no controle de qualidade mitocondrial, já que a interação entre elas regula a morfologia mitocondrial por promover fissão mitocondrial (YU *et al.*, 2011). Mais recentemente,

demonstrou-se que a alfa-sinucleína pode interferir no processo de fissão e fusão, causando declínio na respiração mitocondrial e morte neuronal (GUI *et al.* 2012). Outras funções associadas a essa proteína estão relacionadas à regulação do tráfico de vesículas sinápticas entre a zona ativa e o *pool* de reserva citoplasmático, e sua fibrilização, produz protofibrilas tóxicas que constituem os componentes estruturais primários nos corpos de Lewy.

Os defeitos mitocondriais e estresse oxidativo estão estritamente correlacionados. De fato, toda condição que prejudica a função mitocondrial, seja por causas genéticas ou ambientais, aumenta a formação de ROS (espécies reativas de oxigênio). Neurotoxinas geralmente usadas para obter características de DP em modelos animais são, em sua maioria, toxinas mitocondriais e causam dano oxidativo em massa no trato nigro-estriatal (BLANDINI, 2013).

Outros estudos apontam que a combinação de fatores genéticos e/ou epigenéticos pode agir diminuindo a função vesicular e níveis de VMAT2 – um transportador vesicular de dopamina. As vesículas sinápticas estão envolvidas no processo de estoque e liberação de neurotransmissores e a interrupção de sua função pode provocar diminuição da liberação e aumento citosólico desses neurotransmissores, o que é tóxico para os neurônios (ALTER *et al.*, 2013). Nesse sentido, o papel da dopamina também pode ser enfatizado na patogênese da doença, uma vez que sua oxidação no citosol gera radicais livres, melanina e quinonas. As quinonas geradas são oxidantes e produzem radicais hidroxilas tóxicos, que se ligam e inibem a função de moléculas antioxidantes (BAZZU *et al.*, 2010), como a glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine), intensificando o desequilíbrio no estado redox celular. Além disso, a dopamina oxidada se liga covalentemente à alfa-sinucleína, prejudicando a regulação do tráfico de vesículas sinápticas e contribuindo para a formação dos corpos de Lewi (BLANDINI, 2013).

A neuroinflamação sustentada também tem participação importante na patogênese da DP e acompanha a doença desde seus estágios iniciais (GLASS *et al.*, 2010; HIRSCH; HUNOT, 2009). Os processos inflamatórios, que normalmente participam da proteção e reparo tecidual, podem se tornar deletérios e amplificar o sinal de morte celular no microambiente cerebral. Podem contribuir, em particular, para o dano oxidativo ao sistema nigro-estriatal, o que poderia estar relacionado à liberação maciça de óxido nítrico e subsequente formação de espécies reativas de nitrogênio, pela ativação de sintase induzida por NO, um fenômeno típico associado à ativação de micróglia (MOSLEY *et al.* 2012).

Deficiências nos sistemas de suporte neuronal podem aumentar a susceptibilidade ao processo neurodegenerativo. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF – *Brain-derived neurotrophic factor*) é um membro da família das neurotrofinas, essenciais ao suporte aos neurônios tanto no sistema nervoso central quanto periférico. O BDNF sinaliza através de receptores tirosina quinase B (TrKB) e do receptor p75 (HUANG & REICHARDT, 2001). Tanto o BDNF quanto seu receptor de alta afinidade TrKB são expressos por neurônios dopaminérgicos. Sabe-se que a redução nos níveis cerebrais de BDNF acompanha a condição da DP. Em cultura, o BDNF promove sobrevivência e diferenciação de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (HYMAN *et. al.*, 1991). *In vitro* e *in vivo*, BDNF protege neurônios DA dos efeitos tóxicos de baixas doses das neurotoxinas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Essas evidências sugerem um papel crítico do BDNF no suporte de sobrevivência e diferenciação tanto em neurônios dopaminérgicos de indivíduos saudáveis quanto de parkinsonianos. Essas funções complementam e se sobrepõem com o de outros fatores neurotróficos secretados, incluindo o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF – *glial cell line-derived neurotrophic factor*) e proteínas morfogênicas do osso (BMPs), que também aumentam diferenciação e sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos (BAQUET *et al.*, 2005).

O GDNF é um membro da superfamília de fatores de crescimento transformante-beta. Os órgãos e células dependentes de GDNF para sobrevivência incluem espermatogônias, rins, neurônios do cordão espinhal, neurônios sensoriais e neurônios motores dos nervos cranianos. GDNF também é necessário para captação de dopamina, sobrevivência, e crescimento de neurônios dopaminérgicos em cultura e promove recuperação comportamental e morfológica em roedores e primatas não humanos usados como modelos de DP. Esse fator está diminuído na SN de pacientes com DP e em roedores idosos, sugerindo seu envolvimento na disfunção motora e degeneração neuronal (BOGER *et al.*, 2006).

1.2 Exercício Físico e Doença de Parkinson

Desde a década de 90, há evidências sobre os benefícios do exercício regular na função cerebral, o que poderia ter um importante papel na prevenção e terapêutica de doenças cerebrais associadas a estresse oxidativo. O exercício pode aumentar os níveis de ativação e expressão de mRNA de sistemas antioxidantes cerebrais e minimizar a progressão do dano oxidativo. Essa resposta, no entanto, é dependente do tipo e intensidade da atividade empregada (TUON *et al.*, 2012) sendo que protocolos de exercício moderado parecem ser

mais eficazes em promover função antioxidante protetora no cérebro. (CAMILETTI-MOIRÓN *et al.*, 2013).

Na rotina clínica, intervenções com exercício físico têm sido amplamente utilizadas na reabilitação paliativa de pacientes com doença de Parkinson, mostrando-se eficazes em promover melhora na condição física, força muscular, equilíbrio e execução de atividades diárias (BERGEN *et al.*, 2002; HIRSCH *et al.*, 2003; MIYAI *et al.*, 2000).. Estudos recentes (XU *et al.*, 2010) mostram que o exercício diminui o risco de desenvolver a doença, mas há evidências experimentais controversas (FISHER *et al.* 2004; GERECKE *et al.* 2012).

No cérebro, o exercício aumenta os níveis de fatores de crescimento e de sobrevivência – BDNF e GDNF (TAJIRI *et al.*, 2010), diminui a expressão do transportador de dopamina – DAT (PETZINGER *et al.*, 2007), aumenta o número de receptores D₂ (VUCKOVICK *et al.*, 2010), estimula neurogênese e aumenta a resistência contra insultos causados pelo processo de envelhecimento.

1.3 Músculo esquelético

O músculo esquelético é um órgão extremamente plástico que tem capacidade de se adaptar em resposta a fatores ambientais como calor, hipóxia, disponibilidade de nutrientes, fatores de crescimento e mediadores inflamatórios, bem como a estímulos que modifiquem a atividade contrátil (inatividade, exercício regular, desnervação e estimulação elétrica. Tais adaptações incluem conversão do fenótipo glicolítico rápido a oxidativo lento, ou vice-versa, bem como alteração na massa (atrofia; hipertrofia) ou atividade. O exercício físico é reconhecido como sendo um dos principais responsáveis pela plasticidade muscular, já que é capaz interferir em vias de sinalização que medeiam mudanças metabólicas e fenotípicas específicas. Várias moléculas produzidas pelo músculo, denominadas “miocinas”, tem sua expressão aumentada em resposta à contração sendo as mais importantes as interleucinas IL-6, IL-8 e LIF (*Leukemia inhibitory factor*) e o fator neurotrófico BDNF. Essas moléculas podem atuar como hormônios parácrinos, autócrinos ou endócrinos, e é por este motivo que o músculo esquelético tem sido considerado um órgão endócrino em muitos estudos atuais. Sabe-se que o exercício tem papel favorável no balanço delicado entre essas “miocinas” e evidências sugerem que seu efeito protetor para desordens degenerativas está associado aos efeitos anti-inflamatórios resultantes desse balanço (PRATESI *et al.*, 2013).

A identificação de BDNF como uma possível proteína muscular induzida por contração pode contribuir para os múltiplos efeitos benéficos associados ao exercício (MATTHEWS *et al.*, 2009). Estudos mostraram consistentemente seu aumento no sistema nervoso central e periférico de forma dose-dependente seguindo exercício em esteira (GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2001; OGBORN & GARDINER, 2010). Seu papel no tecido muscular, porém, ainda é pouco compreendido e seu perfil de expressão pode variar em diferentes condições fisiológicas e patológicas (CLOW & JASMIN, 2010).

Considerando-se que alterações no padrão de ativação da resposta motora, observadas na doença de Parkinson, podem se refletir na estrutura das células musculares, trabalhamos com a hipótese da existência de adaptações musculares que possam acompanhar ou preceder os sintomas motores da doença, sendo este o foco do presente trabalho.

A maioria dos estudos relacionados à doença de Parkinson tenta elucidar os mecanismos associados à degeneração de neurônios dopaminérgicos e fatores que possam gerar neuroproteção e neurorestauração. Há carência de estudos que busquem identificar alterações/adaptações musculares associados aos sintomas motores, bem como as bases fisiopatológicas que possam estar relacionadas a essas alterações. Na análise da bibliografia, um estudo (AHLQVIST *et al.*, 1975) relata a existência de alterações estruturais em músculo quadríceps de indivíduos com DP em estágios moderado a grave, entre elas, atrofia das fibras musculares, alterações mitocondriais, dilatação de retículo sarcoplasmático associado a túbulos T, alterações no arranjo paralelo de miofibrilas e presença de granulações nos espaços intermiofibrilares. Outro estudo (PAULA *et al.*, 2013) relata inexistência de alterações morfológicas no músculo sóleo em modelo animal de DP por administração de MPTP. Os autores, no entanto, não descartam a necessidade de investigação ultraestrutural.

Tendo em vista os dados disponíveis na literatura, propusemos a investigação de alterações ultraestruturais em músculo que antecede os sintomas motores em modelo animal neurotóxico para doença de Parkinson.

1.4 Modelo experimental por administração de MPTP

O uso de modelos animais gera avanços no entendimento dos processos envolvidos na DP, sua etiologia, patologia e mecanismos moleculares. Enquanto modelos celulares (*in vitro*) ajudam a identificar eventos específicos, modelos animais – inflamatórios, genéticos ou

tóxicos - reproduzem as características fisiopatológicas, celulares e moleculares da doença, como estresse oxidativo, diminuição de energia e inflamação. Também são úteis para avaliar estratégias neuroprotetoras e neurorestauradoras (BLESA *et al.*, 2012).

O MPTP (1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), uma das toxinas parkinsonianas mais frequentemente usadas em modelos animais, foi descoberto casualmente em 1982, quando um grupo de jovens dependentes de drogas, na Califórnia, desenvolveu forma grave da DP. À época, o MPTP foi identificado como subproduto da síntese química de heroína (LAGSTON, 1993).

A toxina é altamente lipofílica e, após administração sistêmica, atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica. Uma vez no cérebro, entra nos astrócitos e é metabolizada em MPP⁺ - seu metabólito ativo - pela monoamina oxidase-B (MAO-B). Esse metabólito é liberado pelos astrócitos no espaço extracelular via transportador OCT-3 (CUI *et al.*, 2009), sendo captado pelo neurônio por meio do transportador de dopamina (DAT). Uma vez dentro dos neurônios, MPP⁺ pode ser estocado em vesículas via captação pelo transportador monoamina vesicular (VMAT2) ou se deslocar para a mitocôndria e inibir o complexo 1 da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, resultando na liberação de espécies reativas de oxigênio, bem como na diminuição na produção de ATP (BLESA *et al.*, 2012), causando morte neuronal.

A descoberta dessa neurotoxina apontou as mitocôndrias de neurônios dopaminérgicos como alvos preferenciais de toxicidade, abrindo caminho para os estudos que exploraram a função mitocondrial na doença de Parkinson nas décadas seguintes (BLANDINI, 2013).

Embora a etiologia da doença de Parkinson esporádica não seja completamente compreendida, sabe-se que há combinação de fatores genéticos e ambientais. Muitos agentes ambientais potencialmente envolvidos na doença estão emergindo. Em algumas situações esses agentes - xenobióticos no ar, água e alimentos, perfumes, cosméticos, pesticidas, herbicidas e gases de emissão veicular e industrial - podem entrar no cérebro pelo neuroepitélio olfatório (DOTY, 2008). Reforçando esta hipótese, vários estudos mostram que a infusão intranasal de vírus, cádmio, alumínio e manganês, podem resultar na invasão desses agentes no cérebro, causando danos severos no sistema nervoso central (BARNETT & PERLMAN, 1993; HASTING & EVANS, 1991; ZATTA *et al.*, 1993; TJALVE *et al.*, 1996; NORANDIN *et al.*, 2004). Adicionado a isto, 90% dos pacientes de DP exibem disfunção olfatória não relacionada ao estágio da doença ou a uso de medicamentos anti-parkinsonianos.

Compostos que alcançam o epitélio respiratório podem ser absorvidos para a circulação sistêmica, eliminados por *clearence* mucociliar ou engolidos. Uma vez absorvidos para a circulação sistêmica, podem entrar pelo SNC através da barreira hematoencefálica. Quando uma molécula é depositada diretamente no epitélio olfatório há duas rotas possíveis de transporte para o cérebro e/ou fluido cerebro-espinhal (FCE). A primeira é a via epitelial, onde os compostos passam paracelularmente através do epitélio olfatório para os espaços perineurais, cruzando a placa cribriforme e entrando no espaço subaracnóide preenchido com FCE. Daí as moléculas podem se difundir para o tecido cerebral ou ser eliminadas para a circulação sistêmica. A segunda possibilidade é a via do nervo olfatório, onde os compostos podem ser internalizados pelos neurônios olfatórios, por dentro dos quais passam em direção ao bulbo olfatório.

Baseado na teoria e na anatomia favorável do nariz para transferir agentes exógenos para o cérebro, PREDIGER e colaboradores (2010) propuseram um novo modelo experimental que consiste numa única administração intranasal de MPTP em ratos e camundongos. Esse modelo, utilizado no presente trabalho, mostra-se eficaz em produzir prejuízos olfatórios, cognitivos, emocionais e nas funções motoras, dependentes do tempo, que podem ser comparados aos diferentes estágios da doença de Parkinson em humanos, de acordo com a hipótese de Braak.

1.5 Justificativa

A partir da análise bibliográfica realizada sobre o tema, os seguintes aspectos foram observados:

- 1) A doença de Parkinson ainda é considerada uma doença desafiadora, apesar de décadas de extensivos estudos;
- 2) Intervenções com exercício podem exercer efeitos benéficos sobre os sintomas da doença;
- 3) O músculo esquelético é capaz de produzir vários fatores em resposta à contração, o que pode torná-lo um importante intermediário dos efeitos positivos do exercício;
- 4) Apesar dos sintomas motores da doença, há poucos trabalhos que investiguem alterações fisiopatológicas no músculo esquelético em resposta ao déficit dopaminérgico;

5) O modelo animal por infusão intranasal da neurotoxina MPTP reproduz os estágios iniciais da doença e reforça a hipótese da participação de fatores ambientais na etiologia do Parkinson.

Tendo em vistas esses aspectos, o presente trabalho foi idealizado com o objetivo de investigar a presença de alterações estruturais e nos níveis de fatores neurotróficos em músculo esquelético de ratos submetidos à infusão intranasal de MPTP. Associando esse objetivo às linhas de pesquisa do Laboratório Profa. Conceição Machado, propusemo- nos a avaliar os efeitos do exercício físico regular sobre a estrutura fina de células musculares e a produção de fatores neurotróficos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar, em modelo experimental da fase pré-clínica de doença de Parkinson por infusão intranasal de MPTP, a influência de exercício físico em esteira sobre a estrutura celular e a produção de fatores neurotróficos séricos e em músculo esquelético.

2.2 Objetivos específicos

Em ratos adultos machos exercitados em esteira e sedentários, submetidos ou não à infusão intranasal de MPTP, pretende-se avaliar:

- a) o comportamento motor, através dos testes de campo aberto e de impressão de pata;
- b) os níveis dos fatores neurotróficos BDNF e GDNF no soro e nos músculos sóleo e tibial anterior;
- c) a existência de alterações na ultraestrutura das células musculares do músculo sóleo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Holtzman* machos fornecidos, com 45 dias de idade, pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG entre Setembro de 2012 e Agosto de 2013. Os animais foram mantidos no biotério experimental do Departamento de Morfologia do ICB, em gaiolas plásticas (4 animais por gaiola) medindo 41 cm x 31cm x 16 cm, acondicionadas em estante climatizada entre 21 e 23 °C (Alesco, Brasil) com água e ração *ad libitum*, sob ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Todos os procedimentos experimentais e de manejo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da UFMG (CETEA – UFMG) sob n^o de protocolo 24/2011.

Os animais foram divididos em 2 grandes grupos experimentais: o grupo Sedentários, em que os animais não foram submetidos a programa de treinamento físico, e o grupo Corrida, submetido a treinamento regular em esteira. Cada grupo foi subdividido em dois subgrupos: um grupo controle (Salina) e outro que recebeu a neurotoxina para indução de morte de neurônios dopaminérgicos (MPTP). Dessa forma, o presente trabalho foi conduzido com 4 grupos experimentais:

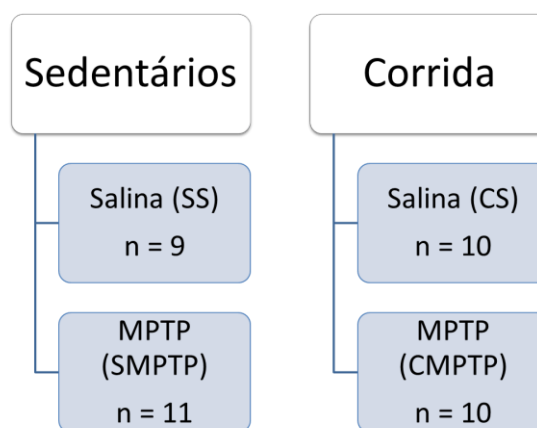


Figura 1: Representação dos grupos experimentais. Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: SS (sedentários que receberam infusão intranasal de salina), SMPTP (sedentários que receberam infusão intranasal de MPTP), CS (exercitados em esteira que receberam infusão intranasal de salina) e CMPTP (exercitados em esteira que receberam infusão intranasal de MPTP). MPTP: 1-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

O delineamento experimental para o grupo de animais sedentários está representado de modo resumido na **figura 2**.

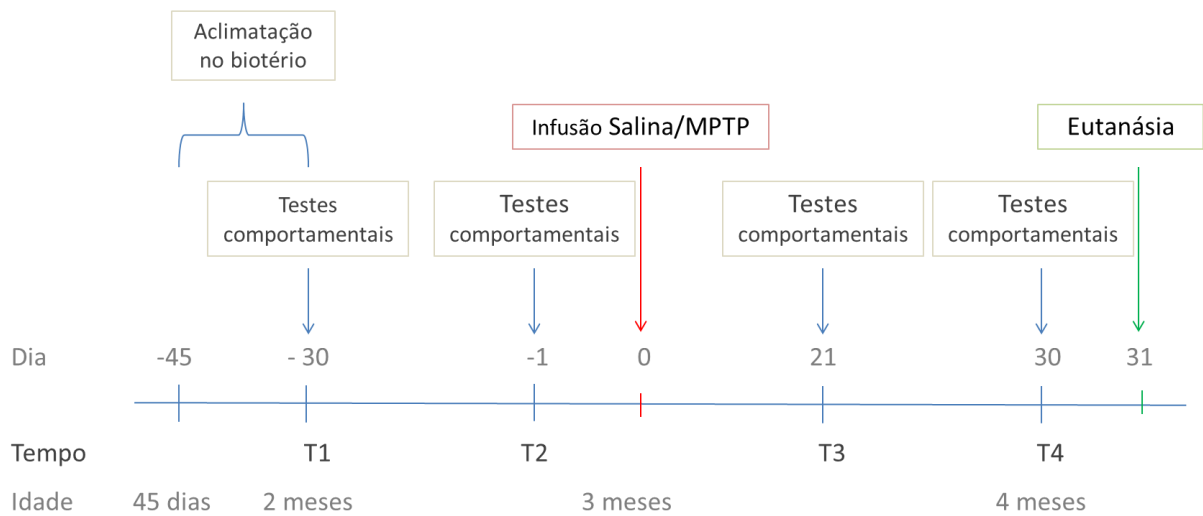


Figura 2: Delineamento experimental para os ratos do grupo sedentários. O período experimental se inicia quando os animais atingem 2 meses de idade (dia -30) e a infusão intranasal de salina ou MPTP ocorre aos 3 meses (dia 0). A condição motora dos animais foi avaliada em: T1 (30 dias antes da infusão); T2 (pré-infusão (dia -1); T3 (21 dias após a infusão); T4 (30 dias após a infusão). Os animais foram eutanasiados no 31º dia após infusão.

Os animais do grupo Sedentários foram mantidos no biotério de experimentação durante todo o período experimental, que se iniciou quando completaram 2 meses de idade, e não foram submetidos a programa de exercício físico forçado. A atividade motora desses animais foi avaliada com testes comportamentais aos dois meses de idade (T1), 1 dia antes da infusão intranasal (T2), 21 dias após a infusão (T3) e 30 dias após a infusão (T4). O sacrifício e coleta de material se deram no 31º dia após infusão (4 meses de idade).

O delineamento experimental para o grupo corrida está representado na **Figura 3** e detalhado no item 3.2.

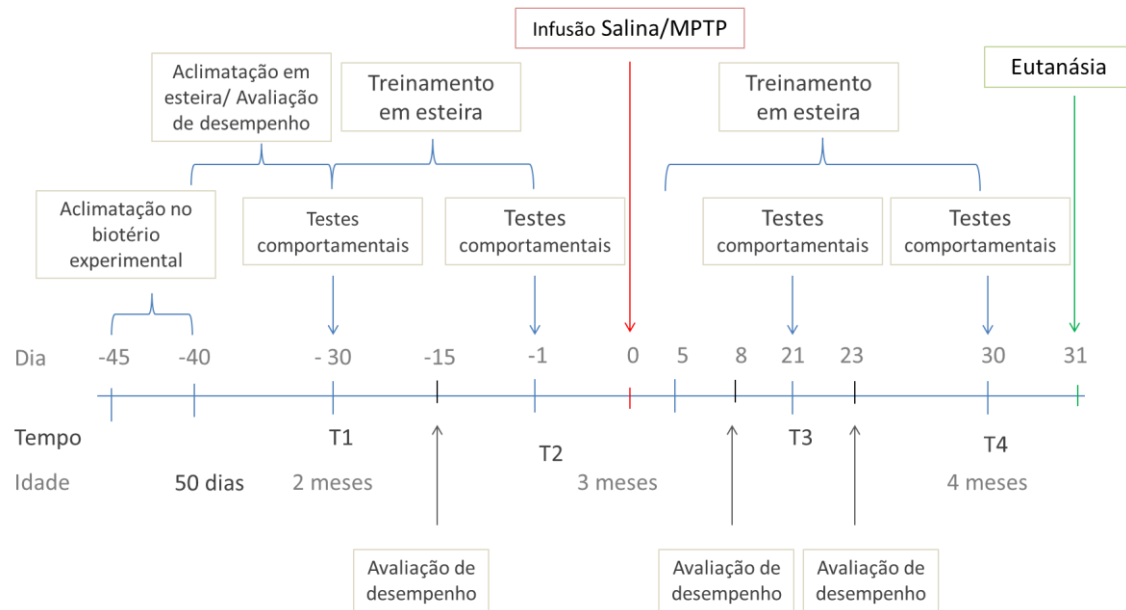


Figura 3: Delineamento experimental para os ratos submetidos a treinamento moderado em esteira (grupo corrida). O período experimental e o treinamento forçado em esteira se iniciam aos 2 meses de idade. Aos 3 meses (dia 0), ocorre a infusão intranasal de salina/MPTP e o treinamento é interrompido por 4 dias sendo retomado no 5º dia e mantido até o fim do período experimental. Avaliações de desempenho físico foram realizadas em diferentes tempos para ajuste da carga do treinamento. A atividade motora foi acessada em T1 (início do treinamento, aos dois meses de idade, dia -30), T2 (após 30 dias de treinamento e pré infusão), T3 (21 dias após a infusão) e T4 (30 dias após a infusão).

3.2 Aclimatação, avaliação de desempenho e treinamento em esteira

Antes do início do treinamento forçado em esteira (Gaustec Magnetismo, Brasil), os ratos do grupo Corrida foram submetidos a processo de aclimatação que se iniciou aos 50 dias de idade. Para isso, os animais foram colocados na esteira parada, ajustada em ângulo de 5 graus de inclinação, com o choque ligado. Decorridos 5 minutos, incrementou-se a velocidade em 1 m.min^{-1} a cada 6 segundos até que a esteira atingisse a velocidade final de 10 m.min^{-1} . Os animais caminharam nesta velocidade por 5 minutos e, ao final desse tempo, a velocidade foi novamente reduzida a zero e os animais retirados da esteira. O processo de aclimatação foi realizado da mesma forma por mais três dias consecutivos, totalizando 4 dias.

Com objetivo de determinar a velocidade de treinamento de intensidade moderada, os animais foram submetidos a três avaliações de desempenho por esforço progressivo, em 3 dias alternados após o término do período de aclimatação. Os animais foram mantidos por 5 minutos na esteira desligada e, depois da mesma ser ligada, a velocidade foi incrementada até 10 m.min^{-1} . A partir de então, a velocidade foi aumentada em 1 m.min^{-1} a cada 3 minutos, até que o animal apresentasse sinais de fadiga. Considerou-se fadiga a permanência do animal sobre o estímulo elétrico por tempo superior a 10 segundos ou seu retorno ao estímulo por 3

vezes por tempo superior a 2 segundos dentro de um mesmo minuto. O cálculo do esforço submáximo, que equivale a 60% da velocidade máxima alcançada, foi realizado para cada animal, utilizando-se a maior velocidade alcançada dentre as três avaliações realizadas (BALTHAZAR *et al.*, 2009; LEITE *et al.*, 2009)

O exercício iniciou-se no dia subsequente à última avaliação de desempenho, aos 2 meses de idade, e foi realizado por 30 dias consecutivos, 30 minutos/dia, incluídos 3 minutos iniciais para aceleração e 2 minutos finais para desaceleração da esteira. A velocidade do exercício em esteira variou de 14 a 22 m.min⁻¹, em acordo com a avaliação individual de desempenho.

Após os 30 dias, realizou-se infusão intranasal de salina/MPTP e os animais retomaram o treinamento a partir do quinto dia pós-infusão, até a data do sacrifício. Para ajuste da carga de exercício ao longo do período experimental, os animais foram submetidos a mais 3 avaliações de desempenho: 15 dias após o início do treinamento (dia -15), 8 e 23 dias após infusão intranasal de salina/MPTP. Os animais do grupo Sedentários foram mantidos no biotério experimental pelo mesmo período de tempo e não tiveram contato com a esteira.

3.3 Testes comportamentais

Foram utilizados os testes de Impressão de pata (*Foot Print test*) e Campo Aberto (*Open Field test*) para avaliação da atividade motora dos animais. Estes foram realizados em 4 momentos ao longo do período experimental: T1 (antes do início da corrida ou data correspondente para os animais sedentários- aos 2 meses de idade); T2 (um dia antes da infusão intranasal); T3 (aos 21 após a infusão) e T4 (aos 30 dias pós infusão).

3.3.1 Teste de impressão de pata

O aparato para realização do teste consistiu em um corredor de madeira medindo 0,06 m de largura x 1 m de comprimento, com abertura nas duas extremidades, sendo uma delas acoplada a uma caixa de madeira escura. Uma fonte de luz foi colocada na entrada do corredor e os ratos deveriam atravessá-lo até alcançar a caixa escura na outra extremidade.

Para adquirir informações sobre a marcha do animal, através da impressão das pegadas, utilizou-se uma faixa de papel milimetrado de 0,06 m de largura e 1 m de comprimento, colocado sobre o assoalho do corredor. Antes de se colocar o animal para

execução do teste, as patas traseiras foram pintadas com tinta atóxica solúvel em água (guache).

Utilizou-se a impressão das patas no papel para cálculo e análise dos seguintes parâmetros: a) largura da base, definida como a distância entre a impressão da pata direita e esquerda dentro do mesmo passo; b) comprimento do passo, definido como a distância entre a impressão de uma pata (direita ou esquerda) e a próxima impressão da pata contralateral e c) comprimento da passada, definida como a distância entre a impressão de uma pata (direita ou esquerda) e a impressão da próxima pata ipsilateral (CRUZ, 2012). Os resultados da análise para cada animal corresponderam às médias aritméticas das medidas de cada parâmetro, excluindo-se as pegadas consideradas irregulares.

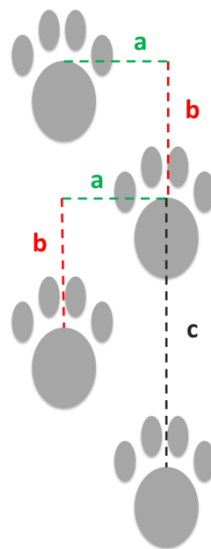


Figura 4: Representação esquemática das pegadas registradas pelo teste de impressão de pata e dos parâmetros avaliados. a) Largura da base, b) Comprimento do passo e c) Comprimento da passada. Os resultados finais de um animal correspondem às médias aritméticas de todas as medidas para cada parâmetro.

3.3.2 Teste de campo aberto

Utilizou-se, para o teste de campo aberto, uma caixa de madeira com revestimento interno preto opaco e medidas de 60 cm x 60 cm x 30 cm. Antes do início de cada teste, o aparato era limpo com álcool 70%. Uma câmera posicionada a cerca de 1 metro acima da caixa, foi utilizada para registrar cada teste realizado. Os animais foram colocados no centro da arena, um por vez, e filmados durante 7 minutos, sem a presença do examinador. Ao final deste tempo, os animais eram retirados do aparato e colocados em gaiola diferente da de origem.

Os vídeos foram analisados utilizando-se o programa Ethovision XT versão 9 (Noldus Information Technology, Holanda). Foram analisados os seguintes parâmetros: número e duração de *rearing* e de *grooming*, distância total percorrida, tempo gasto no centro da arena e velocidade média de deslocamento.

3.4 Infusão intranasal de salina e MPTP

Para infusão intranasal de MPTP (20 mg/mL em salina estéril), os animais foram levemente anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) 2,5% em solução salina (0,7 mL/100g de peso corporal; i.p.). A dose utilizada neste grupo foi inferior à dose padrão (1mL/100g peso corporal; i.p) para evitar que os efeitos depressores da neurotoxina e do anestésico se somassem causando a morte dos animais.

Uma cânula de polietileno PE-50 (*Scientific Commodities Inc.*, EUA) de cerca de 20 cm, acoplada a uma seringa Hamilton de 50 μ L, foi preenchida com 50 μ L da solução de MPTP (20mg/mL), e introduzida na narina esquerda do animal. Ajustando-se a seringa a uma bomba de infusão (*Cole Parmer 74900*), foi possível realizar a infusão da droga a uma taxa de 12,5 μ L/min, durante 4 minutos. Em seguida, o procedimento era realizado na narina direita do animal. Para recuperação, os animais foram mantidos em caixas sobre manta aquecida a 40 °C, por no mínimo 2 horas antes de serem levados novamente até o biotério experimental.

Para infusão de salina, os animais foram anestesiados com 1mL/100g de peso corporal da solução de 2,2,2-tribromoetanol 2,5% em solução salina. Foram infundidos 50 μ L de salina estéril em cada narina utilizando-se o mesmo procedimento descrito para a infusão de MPTP.

3.5 Eutanásia e coleta de material

Aos 31 dias após infusão intranasal de MPTP ou de salina, os animais foram eutanasiados utilizando-se injeção intraperitoneal de uma sobredose (>1mL/kg) do anestésico tribromoetanol (Sigma-Aldrich) a 2,5% em solução salina.

Para obtenção de material para microscopia eletrônica de transmissão, realizou-se perfusão intracardíaca com solução salina contendo heparina, seguida de fixador de

Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4%) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2.

Após perfusão, foram coletadas amostras da porção medial dos músculos sóleo, direito e esquerdo, que foram mantidas na mesma solução fixadora por 24 horas, a 4 °C. Após esse período, a solução foi substituída por tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 e as amostras mantidas refrigeradas até o momento do processamento.

Para determinação dos níveis séricos e musculares de fatores neurotróficos, os animais foram eutanasiados com sobredose do anestésico, como descrito acima. Inicialmente, abriu-se a cavidade torácica dos animais e utilizando-se uma tesoura pequena, cortou-se a aurícula esquerda fazendo acumular sangue na cavidade. O sangue então foi cuidadosamente coletado com auxílio de uma pipeta *pasteur* descartável (volume 3 mL) e delicadamente colocado em tubos para centrifugação com tampa, sem acréscimo de substâncias anticoagulantes. Os músculos tibial e sóleo foram retirados inteiros, dos membros inferiores direito e esquerdo, e esses foram imediatamente pesados e congelados em nitrogênio líquido. O sangue coletado foi deixado sob refrigeração (4 °C) por 3 horas ou mais, até a coagulação completa e em seguida centrifugado a 2.500 rpm, por 12 minutos a 4 °C. O sobrenadante (soro) foi coletado e aliquoteado em microtubos de 0,5 mL. Todas as amostras coletadas a fresco foram posteriormente armazenadas em freezer – 70 °C até o momento da sua utilização.

3.6 ELISA

Os tecidos coletados a fresco e congelados a -70 °C foram homogeneizados em tampão de lise (Tris-HCl 20 mM pH8,0; NaCl 137mM; NP401%, Glicerol 10%, PMSF 1mM; Pespstatina A 1µM; EDTA 10mM; E-64 10 µM; Vanadato de sódio 0,5 mM) por 20 segundos utilizando-se sonicador. O homogenato obtido foi centrifugado a 14.000 rpm, a 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -70°C até momento do uso.

Os níveis dos fatores neurotróficos BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) e GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*) do soro e homogenato dos músculos sóleo e tibial foram determinados utilizando-se os kits comerciais *Human BDNF DuoSet, 15 plate* (R&D Systems) e *GDNF Emax® ImmunoAssay System* (Promega), respectivamente. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as recomendações dos fabricantes.

A intensidade da coloração obtida para todas as amostras foi determinada por medidas de densidade óptica a 450 nm utilizando-se leitor de microplacas (BioTek). Os valores de concentração das amostras foram determinados utilizando-se curva padrão de acordo com o especificado em cada kit. As curvas foram geradas utilizando-se o programa Graphpad Prisma 6. Os níveis de fatores neurotróficos para os homogenatos foram expressos em pg/mg de proteína total, e para determinação dos níveis de proteína, utilizou-se o método de Bradford. No soro, os níveis foram expressos em pg/mL (GDNF) e ng/mL (BDNF) de soro.

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão

3.7.1 Processamento das amostras

As amostras de músculo sóleo fixadas foram submetidas a 3 lavagens com duração de 10 minutos cada com tampão cacodilato 0,1 M, seguida de fixação secundária com solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2% e ferrocianeto de potássio (KFeCN_6) a 1,6% em tampão cacodilato 0,1 M, por 2 horas a temperatura ambiente. Decorrido este período, realizou-se nova lavagem com tampão (3x 10min) e desidratação em concentrações crescentes de álcool - 35%, 50%, 70%, 85%, 95% - 2x 10 minutos cada; 3x 10 minutos em álcool absoluto e 2x de 20 minutos em acetona P.A. As amostras foram, a seguir, incluídas em resina Epon 812, em estufa a 40 °C por 1 hora e a 60 °C por 48 horas.

Cortes semifinos de 250 nm foram obtidos com navalha de vidro de 8 mm em micrótomo (Leica EM UC6) e depois corados com Azul de toluidina. Esses cortes, montados sobre lâminas, foram visualizados em microscópio óptico (Zeiss Primo Star) para avaliação e seleção de região de interesse. Foram selecionadas regiões em que as fibras estivessem orientadas longitudinalmente e em bom estado de fixação.

Depois de selecionar as regiões de interesse, realizaram-se cortes ultrafinos de 55 nm de espessura utilizando-se navalha de diamante (DIATOME, ultra 45°). Os cortes foram coletados em telas de Cobre de 300 *mesh* e contrastados com solução aquosa de acetato de uranila 2% por 8 min a 60 °C seguida de solução de citrato de chumbo (solução de Reynold's) por 5 minutos a temperatura ambiente.

Todas as etapas do processamento foram realizadas no Centro de Microscopia da UFMG.

3.7.2 Aquisição e análise de imagens

Imagens digitais dos cortes ultrafinos foram capturadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai-G2-Spirit com aceleração de 120 kV.

Para análise ultraestrutural das amostras de músculo foram obtidas 25 imagens por animal com magnificação final de 9.300x. Outros aumentos - 21.500x, 26.000x e 43.000x - foram utilizados para visualização de detalhes. As imagens foram capturadas a partir de 3 a 5 fibras diferentes, escolhidas aleatoriamente de cada amostra, e foram analisados 3 animais de cada um dos grupos experimentais (SS, SMPTP, CS e CMPTP).

A análise das imagens digitais se deu com auxílio do programa de análise de imagens *ImageJ*. Utilizou-se um gradeado de 165 pontos, totalizando uma área de 84,272 μm^2 por imagem. Área total analisada por animal foi de 2.106,80 μm^2 , correspondente à soma das 25 imagens. As estruturas celulares localizadas em cada ponto de interseção do gradeado foram utilizadas para quantificação. Foram analisadas as porcentagens de distribuição de mitocôndrias, mitocôndrias alteradas, miofibrilas, tríades (inclui túbulos T e retículo sarcoplasmático isolados), sarcoplasma e outras estruturas (núcleo, célula satélite, vasos e gotículas lipídicas). Os dados gerados foram organizados em uma planilha no Excel e utilizados para análise estatística.

3.8 Análise estatística

Os dados gerados foram considerados paramétricos pelos testes de normalidade utilizados - Omnibus D'Agostino e Pearson e Kolmogorov-Smirnov. Utilizaram-se os testes t de Student não-pareado (*Two-tailed P value*) e Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas valores com $p < 0,05$, e os gráficos foram confeccionados utilizando-se valores de média +/- erro médio padrão (EMP). Todas as análises foram realizadas através do programa *Graphpad Prisma* versão 5.0 (*GraphPad Software Inc.*, 2007).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Ganho de peso corporal

O período experimental se iniciou quando os animais estavam com 2 meses de idade (Dia -30). Esta data corresponde ao início do treinamento físico em esteira para os animais incluídos nos grupos Corrida/salina (CS) e Corrida/MPTP (CMPTP), quando foi realizada a primeira pesagem. Os animais foram pesados também nas datas da infusão intranasal (Dia 0) e do sacrifício (Dia 30). A **figura 5** mostra o peso corporal dos animais sedentários e exercitados, submetidos à infusão de salina ou de MPTP, nesses três períodos experimentais.

Em cada um dos períodos analisados, não se observou diferença significativa no peso corporal médio entre os grupos experimentais, indicando que o exercício físico e a infusão intranasal não interferiram com o ganho de peso dos animais. Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da variável analisada encontram-se no Apêndice A, página 85.

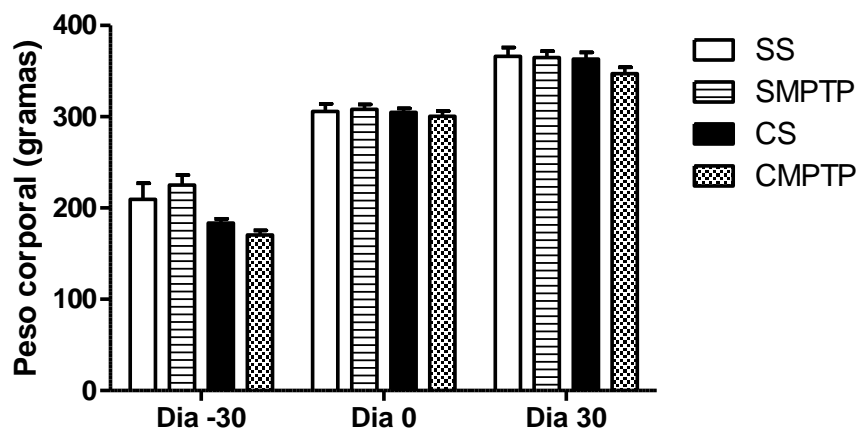


Figura 5: Média do peso corporal (e desvio padrão), em gramas, dos quatro grupos experimentais aos dias -30 (início do exercício em esteira), dia 0 (infusão intranasal) e dia 30 (após infusão de salina ou MPTP). SS: grupo sedentários submetidos a infusão intranasal de salina; SMPTP: grupo Sedentários submetido a infusão intranasal de MPTP; CS: grupo Corrida submetido à infusão intranasal de salina; CMPTP: grupo Corrida submetido à infusão intranasal de MPTP. Em cada um dos períodos experimentais não se observou diferença entre os grupos. Teste Two-way ANOVA, pós teste Bonferroni.

4.2 Desempenho físico na esteira

Foram realizadas 3 avaliações de desempenho, em 3 dias alternados que antecederam o início do treinamento em esteira (Dias -35, -33 e -31). A velocidade individual máxima alcançada nessas três avaliações permitiu calcular a velocidade a ser utilizada na corrida em esteira, equivalente a 60% do valor máximo.

Após 15 dias de exercício em esteira (Dia -15), uma nova avaliação indicou melhora significativa no desempenho desses animais (**Figura 6**). Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da variável analisada encontram-se no Apêndice A, página 85.

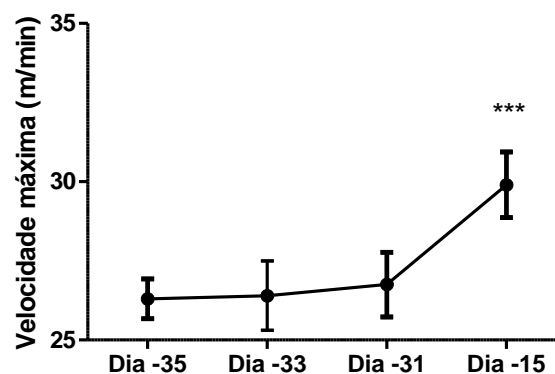


Figura 6: Avaliação de desempenho em esteira. As três primeiras avaliações foram realizadas em 3 dias alternados (Dia -35, Dia -33 e Dia -31) que antecederam o início do treinamento. A quarta avaliação foi realizada quinze dias após o início do treinamento (Dia -15) e indicou melhora no desempenho físico dos animais ($p < 0,05$). Teste Two-way ANOVA.

4.2.1 Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre o desempenho físico na esteira

A **Figura 7** mostra os valores médios de velocidade máxima durante a avaliação de desempenho realizada no 8º e no 23º dia após infusão intranasal de salina ou de MPTP. Ambos os grupos (CS e CMPTP) apresentaram desempenho semelhante nesses dois períodos. Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da variável analisada encontram-se no Apêndice A, página 85.

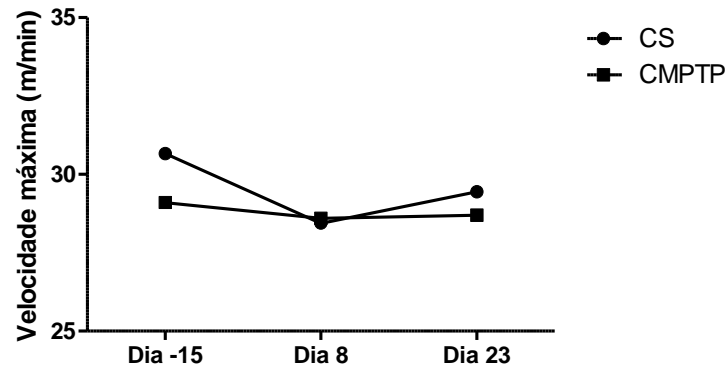


Figura 7: Avaliação de desempenho físico em esteira realizada no 8º e no 23º dia após a infusão intranasal de salina ou de MPTP. Não houve diferença entre os grupos ($p>0,05$). Teste Two-way anova, pós-teste Bonferroni.

4.3 Efeito do exercício em esteira sobre o comportamento em teste de impressão de pata

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) para todos os parâmetros analisados no teste de impressão de pata encontram-se no Apêndice B, página 86 e 87. Os animais submetidos a 30 dias consecutivos de treinamento forçado em esteira (intervalo entre T1 e T2) apresentaram aumento significativo ($p<0,001$) do comprimento médio do passo e comprimento médio da passada (Figura 8A e 8B, respectivamente). A largura média da base não foi afetada pelo exercício em esteira (dados não apresentados).

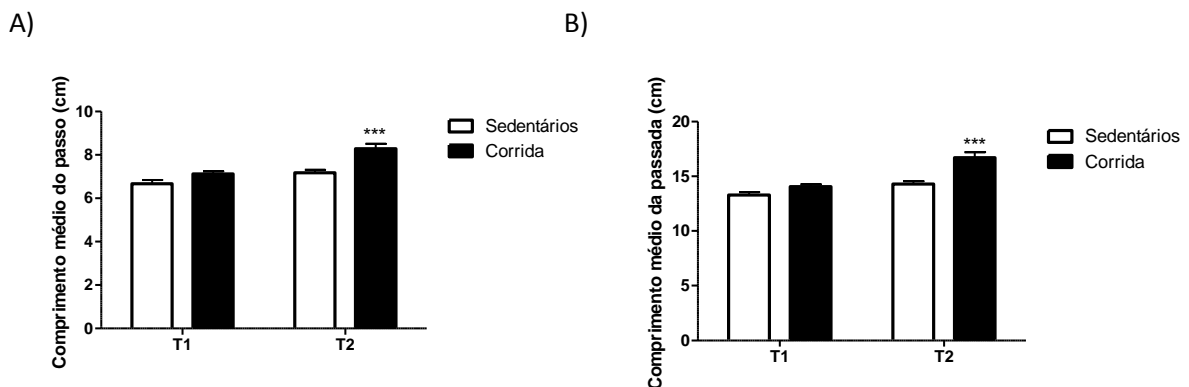


Figura 8: O exercício regular em esteira aumenta o comprimento do passo e da passada (patas traseiras) dos animais. A) Comprimento médio do passo medido em T1 (antes do início do treinamento em esteira, T2 (após 30 dias consecutivos de treinamento). B) Comprimento médio da passada medido nos mesmos períodos T1 e T2. Teste Two-way ANOVA. $P<0,001$.

4.4 Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre o comportamento em teste de impressão de pata

Os parâmetros largura média da base, comprimento médio do passo e comprimento médio da passada, analisados nos animais que receberam infusão intranasal de MPTP, não mostraram diferenças significativas quando comparados aos animais que receberam salina. Os resultados são semelhantes para os animais sedentários e submetidos ao treinamento forçado em esteira (**Figura 9**), o que indica que o MPTP não induziu distúrbios de movimento detectáveis pelo teste de impressão de pata nos grupos experimentais. Os resultados apresentados correspondem às medidas realizadas a partir das pegadas das patas traseiras.

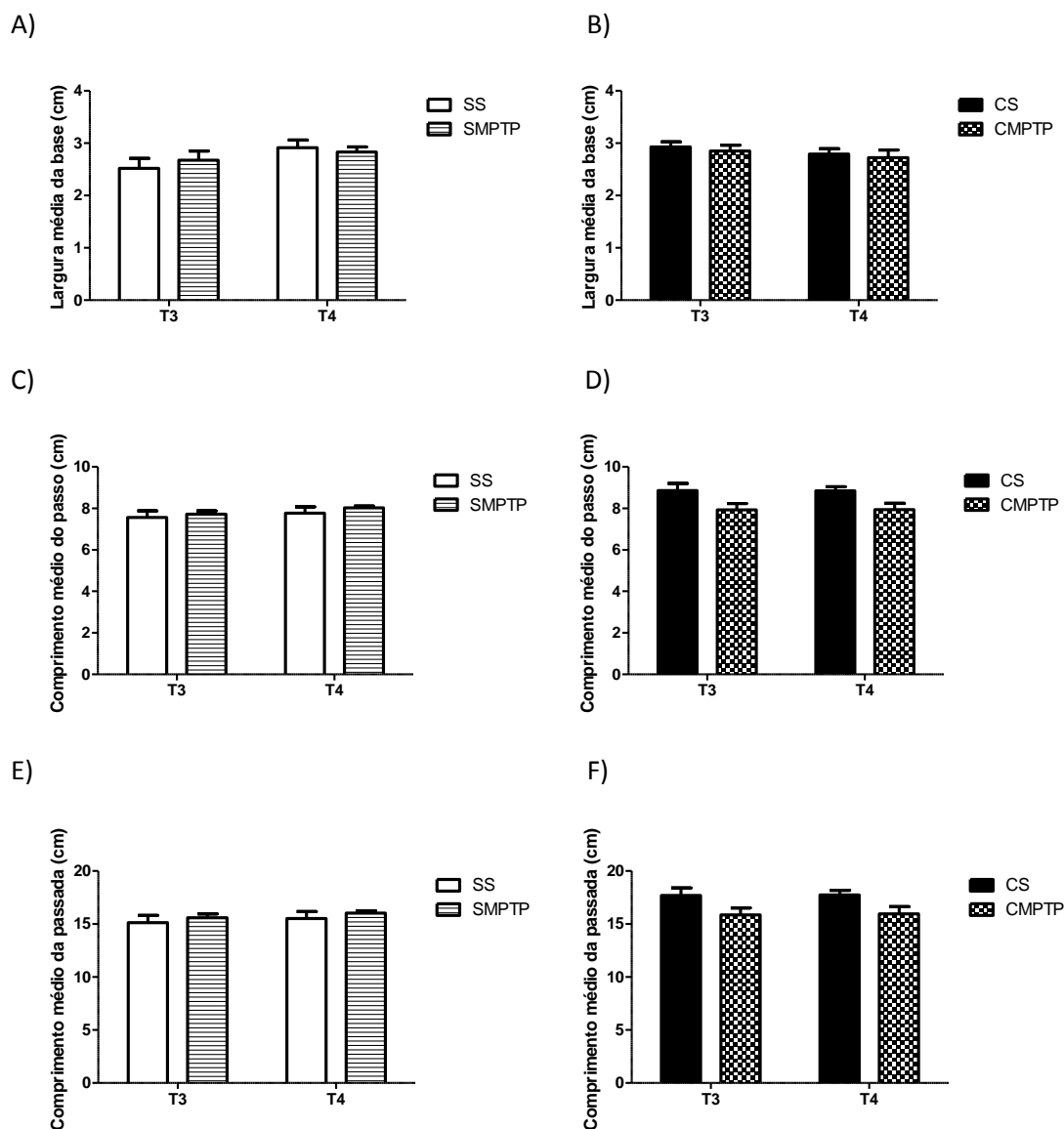


Figura 9: A infusão intranasal cm MPTP não alterou a largura média da base, o comprimento médio do passo e da passada nos grupos Sedentários e Corrida. A, C e E - animais sedentários; B, D e F – animais submetidos a treinamento em esteira. Teste Two-way ANOVA.

4.5 Efeito do exercício em esteira sobre o comportamento em teste de campo aberto

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) dos parâmetros analisados no teste de campo aberto encontram-se no Apêndice C, páginas 88 e 89.

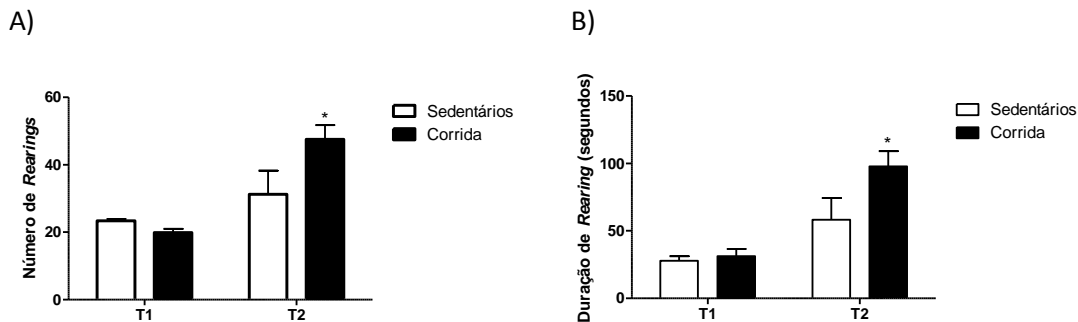


Figura 10: Exercício em esteira promoveu aumento do comportamento de *rearing*. A) Número total de rearings realizados e B) Tempo total de *rearing*. Teste Two-way ANOVA.

A **figura 10** mostra que o exercício físico regular promoveu aumento da curiosidade exploratória dos animais, quando comparados aos sedentários (T2). O número total de *rearings* ($p = 0,0399$); e a duração, em segundos, desse comportamento estereotipado ($p = 0,0408$) são maiores naquele grupo.

Os outros parâmetros avaliados no teste - número e duração de *grooming*, distância total percorrida, tempo gasto na região central do aparato/arena e velocidade média – não foram afetados pelos 30 dias consecutivos de treinamento em esteira (dados não apresentados).

4.6 Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre os comportamento em teste de campo aberto

As **figuras 11 e 12** resumem os resultados obtidos pela análise dos parâmetros número e duração de *rearing* e *grooming*. Os gráficos comparam as respostas dos animais submetidos à infusão de salina com as dos animais submetidos à infusão de MPTP, em dois tempos: 21 dias pós-infusão (T3) e 30 dias pós-infusão (T4). Utilizou-se o teste Two-way ANOVA com pós-teste Bonferroni.

A infusão intranasal de MPTP não gerou alteração no número e duração de *rearing* realizados pelos animais sedentários (**Figura 11, A e C**) e nos animais submetidos ao treinamento regular em esteira (**Figura 11, B e D**).

O comportamento de *grooming* (número e duração) também não foi afetado pela neurotoxina nos animais sedentários (**Figura 12, A e C**) e nos animais treinados em esteira (**Figura 12, B e D**).

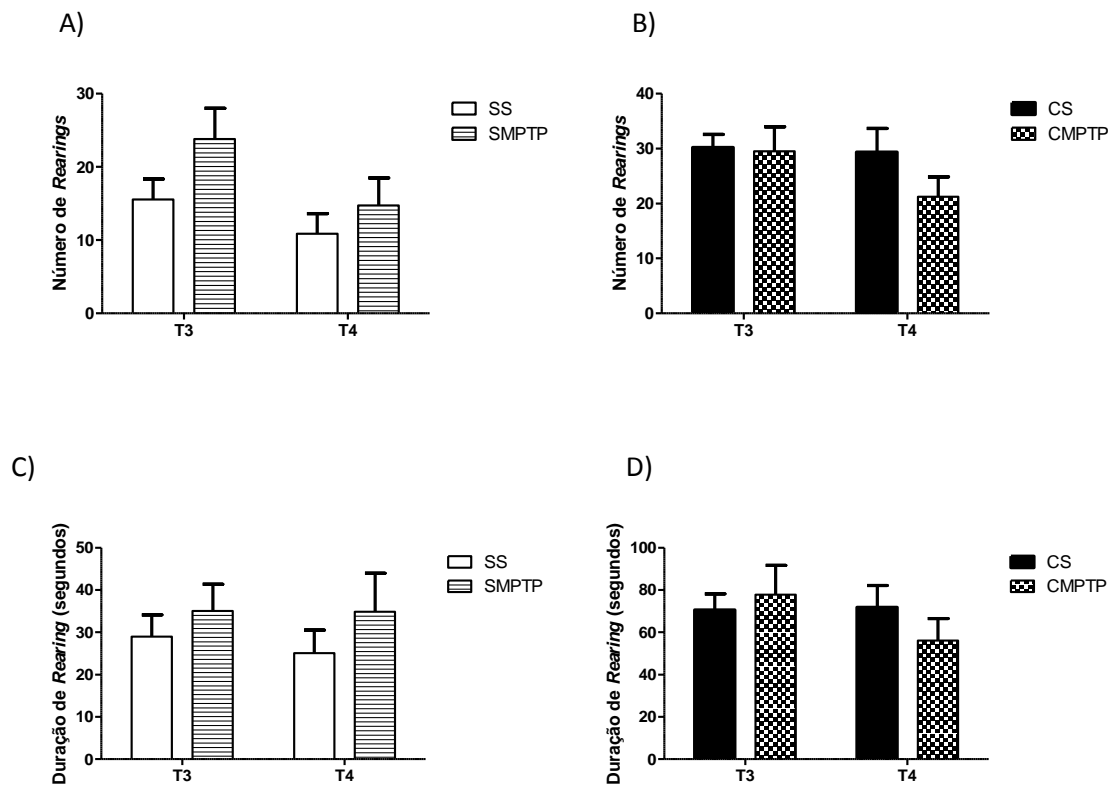


Figura 11: Número e duração de *rearing*s aos 21 e 30 dias (T3 e T4) após infusão intranasal de salina/MPTP. A) Número de *rearing*s nos animais sedentários; B) Número de *rearing*s nos animais submetidos a treinamento em esteira; C) Duração de *rearing* em animais sedentários e D) Duração de *rearing* em animais submetidos a treinamento. Teste Two-way ANOVA.

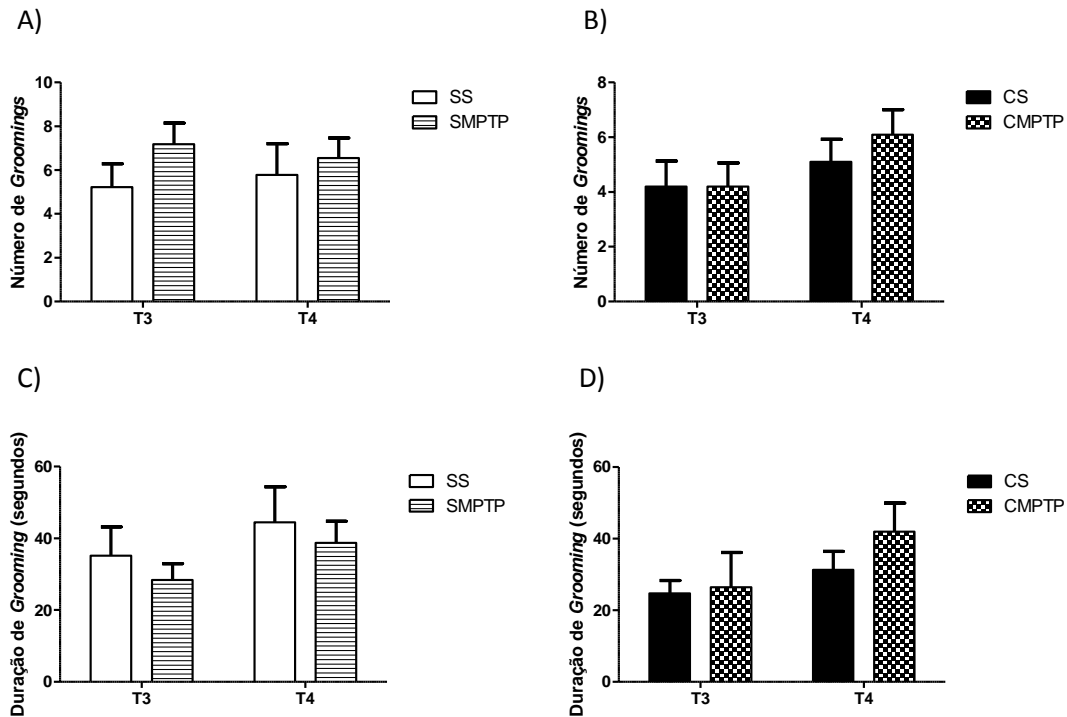


Figura 12: Número e duração de *grooming* aos 21 e 30 dias (T3 e T4) após infusão intranasal de salina/MPTP . A) Número de *groomings* nos animais sedentários; B) Número de *groomings* nos animais submetidos a treinamento em esteira; C) Duração de *grooming* em animais sedentários e D) Duração de *grooming* em animais submetidos a treinamento.

Os animais sedentários submetidos à infusão intranasal de MPTP, quando comparados àqueles que receberam infusão de salina, apresentaram aumento da distância total percorrida no teste (**Figura 13, A**), bem como aumento do tempo gasto no centro da arena (**Figura 14, A**) e da velocidade média (**Figura 15, A**). Todas as diferenças foram observadas aos 21 dias pós-infusão (T3), mas não aos 30 dias (T4), indicando um aumento de atividade transitório induzido pelo MPTP.

No grupo dos animais submetidos à corrida, no entanto, tais parâmetros não foram alterados pela administração da neurotoxina em nenhum dos tempos analisados (**Figuras 13 a 15, B**), não havendo, portanto, diferenças significativas entre os grupos (CS e CMPTP). Os dados apresentados nos gráficos foram analisados pelo teste Two-way ANOVA.

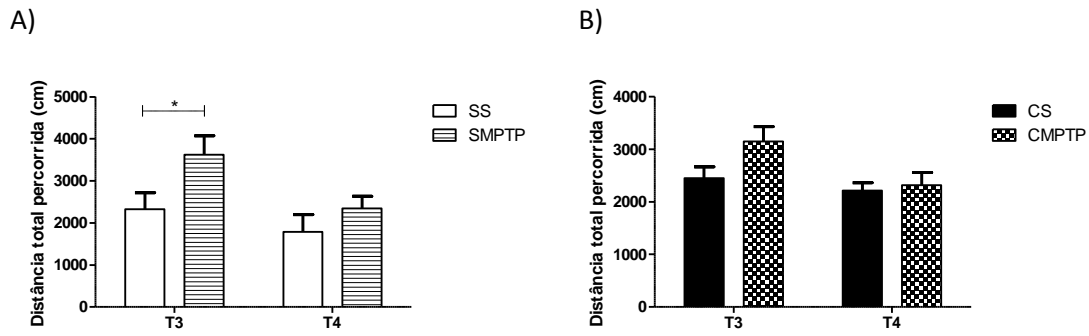


Figura 13: Distância total percorrida (cm) em teste de campo aberto. A) Os animais sedentários submetidos à infusão intranasal de MPTP percorreram distância significativamente maior ($p < 0,05$) em T3 (21 dias pós infusão), quando comparados com o grupo sedentários/salina. B) Os animais exercitados em esteira não mostraram alteração nesse parâmetro após infusão intranasal de MPTP ($p > 0,05$).

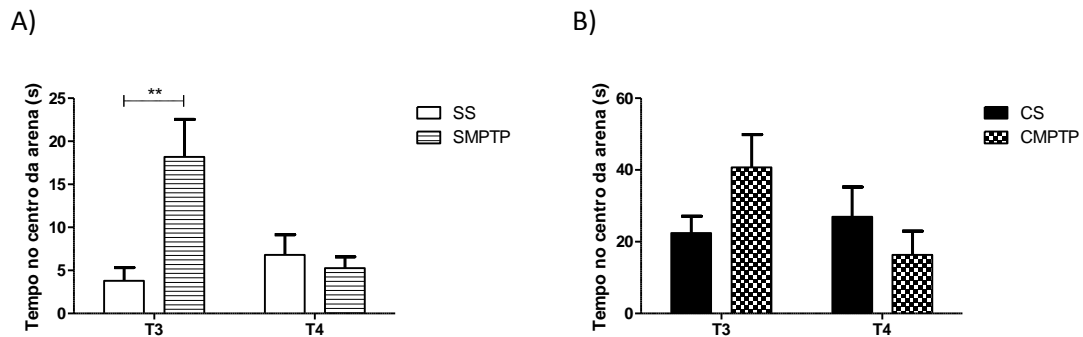


Figura 14: Tempo no centro da arena em teste de campo aberto. A) Os animais sedentários submetidos à infusão intranasal de MPTP exploraram por mais tempo ($p < 0,01$) o centro da arena em T3, quando comparado com o grupo sedentário/salina. B) Os animais exercitados em esteira não mostraram alteração nesse parâmetro após infusão intranasal de MPTP ($p > 0,05$).

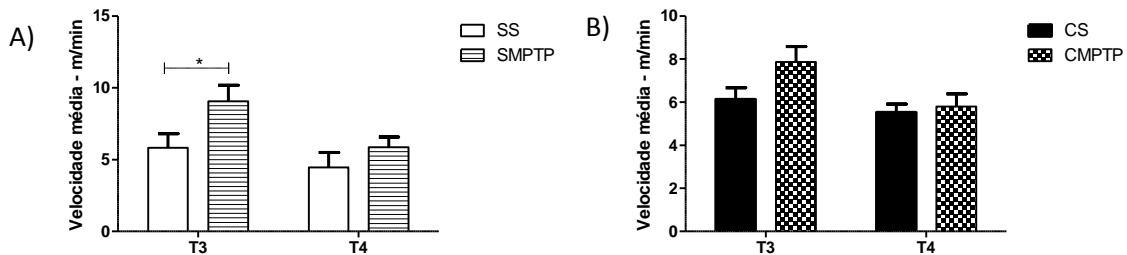


Figura 15: Velocidade média (m/min) em teste de campo aberto. A) Os animais sedentários submetidos à infusão intranasal de MPTP apresentaram maior velocidade média ($p < 0,05$) em T3, quando comparados com o grupo sedentário/salina. B) Os animais exercitados em esteira não mostraram alteração nesse parâmetro após infusão intranasal de MPTP ($p > 0,05$).

4.7 Níveis séricos e musculares de fatores neurotróficos

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) das variáveis analisadas nesta sessão encontram-se no Apêndice D, página 90.

4.7.1 Efeito do exercício em esteira

Os animais submetidos ao treinamento em esteira antes e após infusão com salina apresentaram redução significativa dos níveis séricos de BDNF ($p < 0,001$) quando comparados aos animais sedentários (**Figura 16, A**).

Os níveis de BDNF nos músculos sóleo e tibial (**Figura 16, B e C**, respectivamente), mostraram-se semelhantes nos grupos sedentários e corrida ($p > 0,05$).

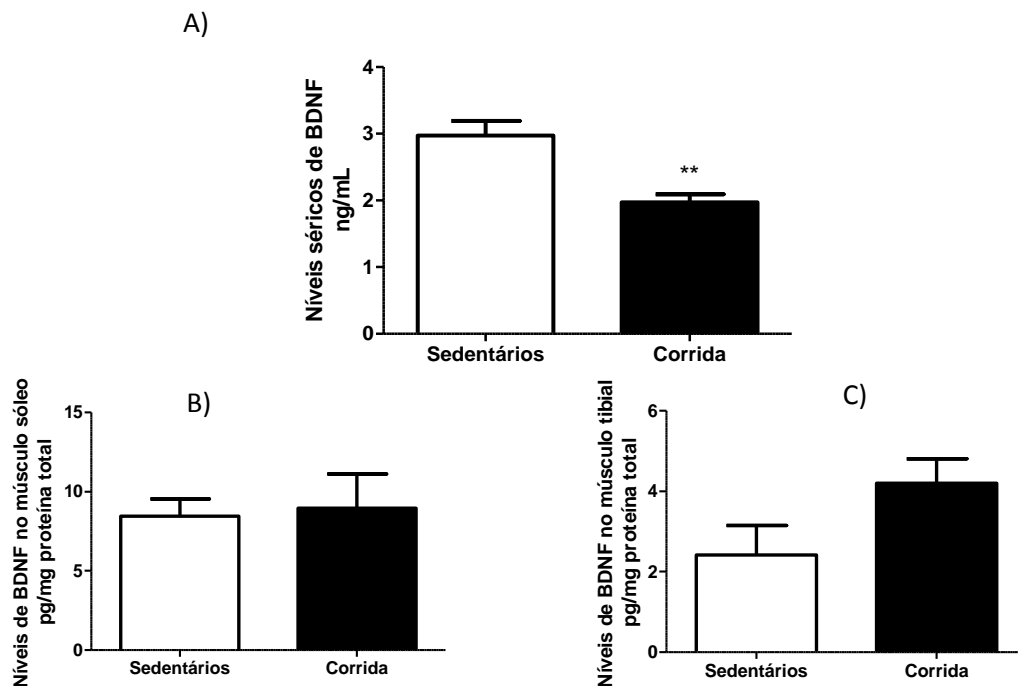


Figura 16: Efeito do exercício em esteira sobre os níveis de BDNF no soro (A) e músculos sóleo (B) e tibial (C). A) Os animais submetidos ao treinamento em esteira apresentaram redução nos níveis séricos de BDNF ($p < 0,01$). B) e C) Os níveis musculares de BDNF foram semelhantes em ambos os grupos. Teste t não pareado.

O exercício forçado em esteira não alterou os níveis de GDNF no soro e músculo tibial (**Figura 17, A e B**). Não foi possível determinar os níveis desse fator no músculo sóleo.

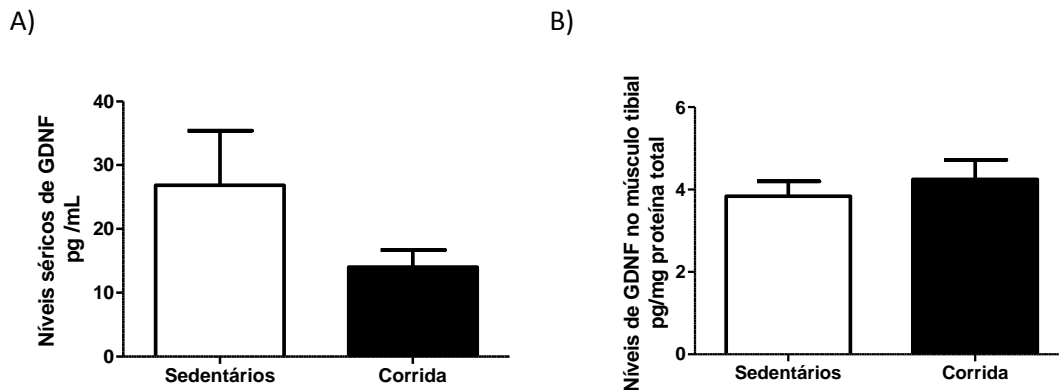


Figura 17: Efeito do exercício em esteira sobre os níveis de GDNF no soro (A) e músculo tibial (B). Não houve diferenças significativas entre os grupos. Teste t não pareado.

4.7.2 Efeito da infusão intranasal de MPTP

As **figuras 18, 19 e 20** apresentam os resultados para os níveis de BDNF nos soro, músculo sóleo e músculo tibial, respectivamente.

Os animais sedentários submetidos à infusão intranasal de MPTP apresentaram redução nos níveis séricos de BDNF ($p < 0,05$) e no músculo sóleo ($p < 0,01$), quando comparados aos animais que receberam salina (**Figuras 18 e 19**). Essas diferenças, no entanto, não foram observadas nos animais submetidos a treinamento em esteira. As análises realizadas no músculo tibial não geraram diferenças significativas em nenhum dos grupos experimentais (**Figura 20**).

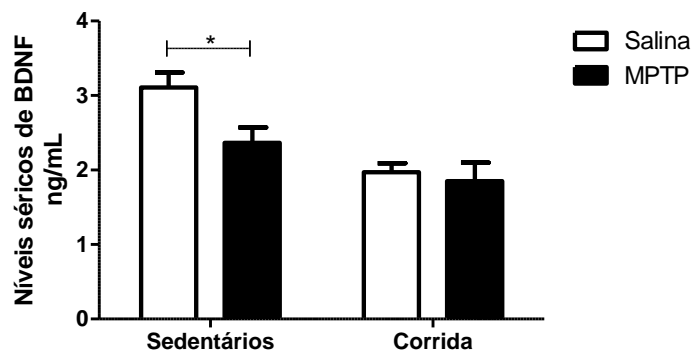


Figura 18: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre os níveis séricos de BDNF. Os animais sedentários submetido à infusão intranasal de MPTP (SMPTP) apresentaram redução ($p < 0,05$) nos níveis séricos de BDNF quando comparados aos animais salina. Os animais exercitados em esteira não mostraram alteração nesse parâmetro após infusão intranasal de MPTP ($p > 0,05$). Two way ANOVA.

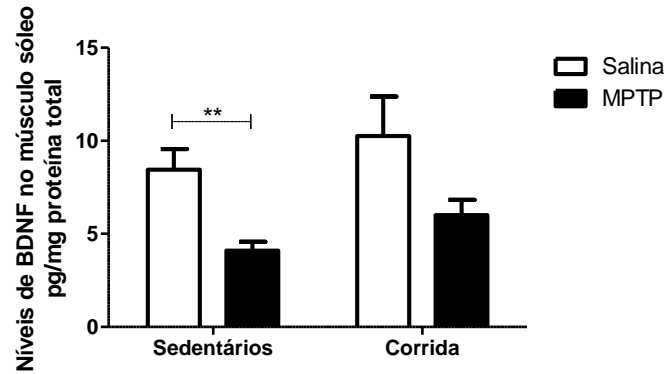


Figura 19: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre os níveis de BDNF no músculo sóleo. Os animais sedentários submetidos a infusão de MPTP apresentaram redução ($p < 0,01$) nos níveis de BDNF no músculo sóleo quando comparados aos animais salina. Os animais exercitados em esteira não mostraram alteração nesse parâmetro após infusão intranasal de MPTP ($p > 0,05$). Teste Two-way ANOVA.

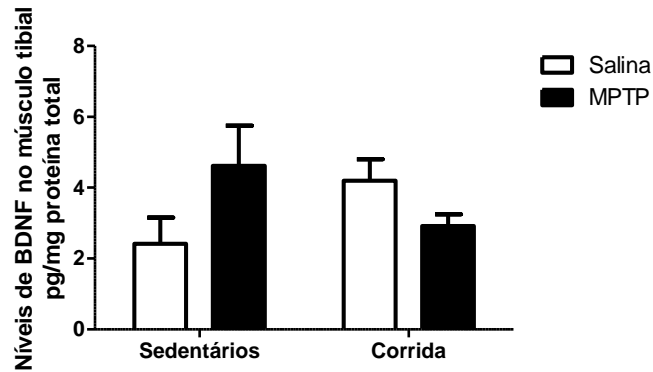


Figura 20: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre os níveis de BDNF no músculo tibial. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Two-way ANOVA.

A administração da neurotoxina não gerou alterações nos níveis de GDNF no soro e no músculo tibial (**Figuras 21, A e B**, respectivamente). Não foi possível determinar os níveis no músculo sóleo.

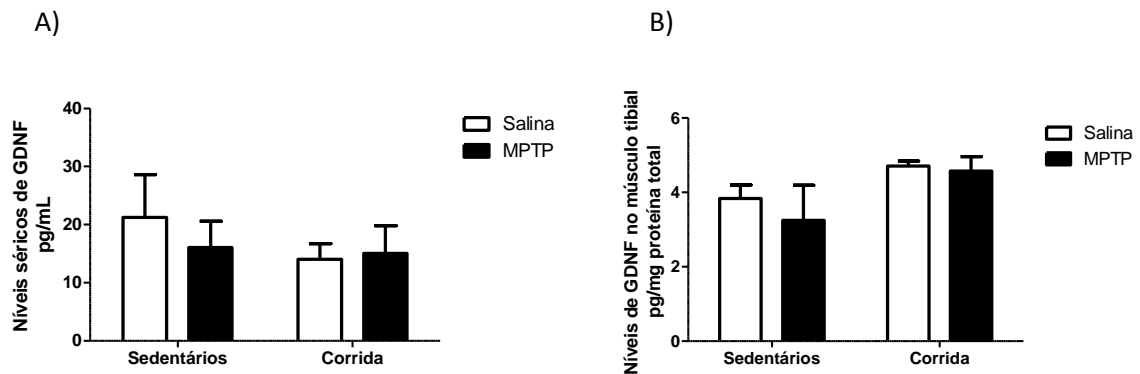


Figura 21: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre os níveis séricos e musculares de GDNF. A) Soro e B) Músculo tibial. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Two-way ANOVA.

4.8 Microscopia eletrônica de transmissão

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) das variáveis analisadas nesta sessão referem-se ao músculo sóleo e encontram-se no Apêndice E, páginas 91 e 92.

4.8.1 Perfil de mitocôndrias no músculo sóleo

4.8.1.1 Efeito de exercício em esteira

Os animais submetidos ao exercício forçado em esteira, quando comparados aos animais sedentários, apresentaram aumento na porcentagem relativa de perfis mitocondriais no músculo sóleo (**Figura 22**, $p < 0,05$).

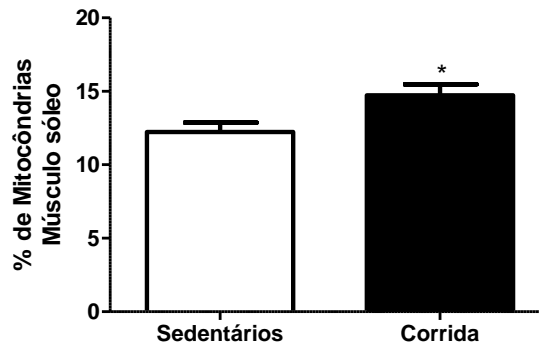


Figura 22: Efeito do exercício em esteira sobre a porcentagem relativa de perfis mitocondriais no músculo sóleo. O grupo treinado apresentou aumento na porcentagem relativa de perfis mitocondriais ($p > 0,005$). Teste t não pareado.

Observou-se ainda que os animais exercitados apresentaram menores porcentagens de perfis mitocondriais alterados ($p < 0,0001$), quando comparados aos sedentários (**Figura 23**).

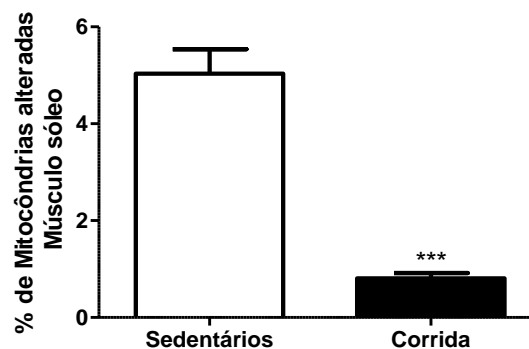


Figura 23: Efeito do exercício sobre a estrutura dos perfis mitocondriais de músculo sóleo. Amostras de músculo sóleo dos animais submetidos ao treinamento em esteira apresentaram menor frequência relativa de mitocôndrias com alterações ultraestruturais, quando comparados aos sedentários. Teste t não pareado.

4.8.1.2 Efeito da infusão intranasal de MPTP

A infusão intranasal de MPTP não produziu diferenças significativas nas porcentagens relativas de perfis mitocondriais no músculo sóleo (**Figura 24**).

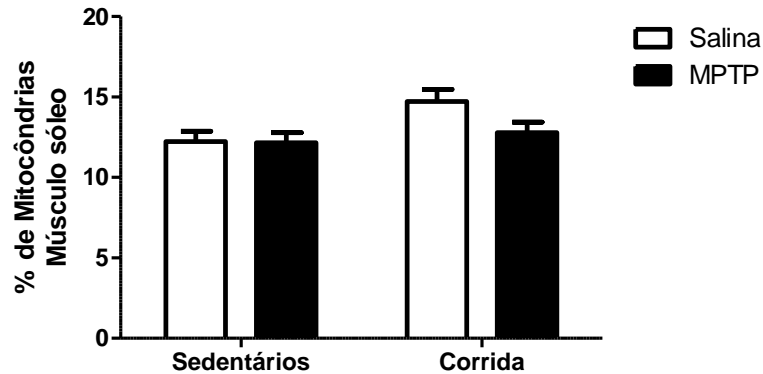


Figura 24: Efeito da infusão de MPTP sobre a porcentagem relativa de perfis mitocondriais no músculo sóleo. Teste Two-way ANOVA.

No entanto, a **Figura 25**, abaixo, mostra que a porcentagem das organelas que apresentaram algum tipo de alteração estrutural encontrou-se elevada no grupo SMPTP ($p < 0,05$) e no grupo CMPTP ($p < 0,0001$).

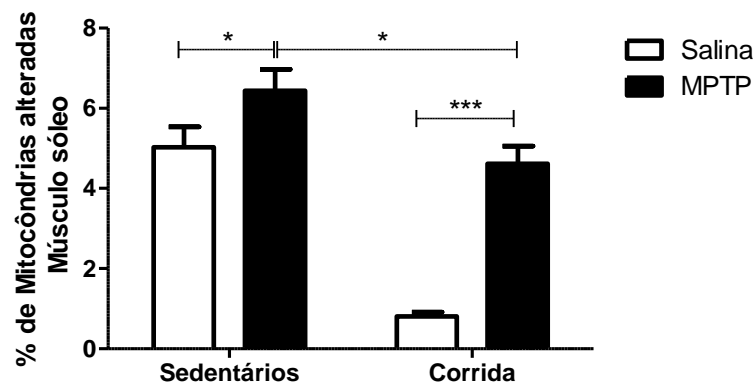


Figura 25: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre a estrutura dos perfis mitocondriais de músculo sóleo. Animais sedentários e treinados em esteira apresentaram aumento na porcentagem relativa de mitocôndrias com algum tipo de alteração ultraestrutural. Teste Two-way ANOVA.

A **figura 26**, a seguir, ilustra as alterações mitocondriais mais comumente encontradas nas amostras analisadas. Os tipos de alterações mais comuns foram: aumento de volume, presença de cristas com disposição irregular, aspecto de “esvaziamento” da organela, envelhecimento de cristas/membranas e presença de inclusões elétron-densas.

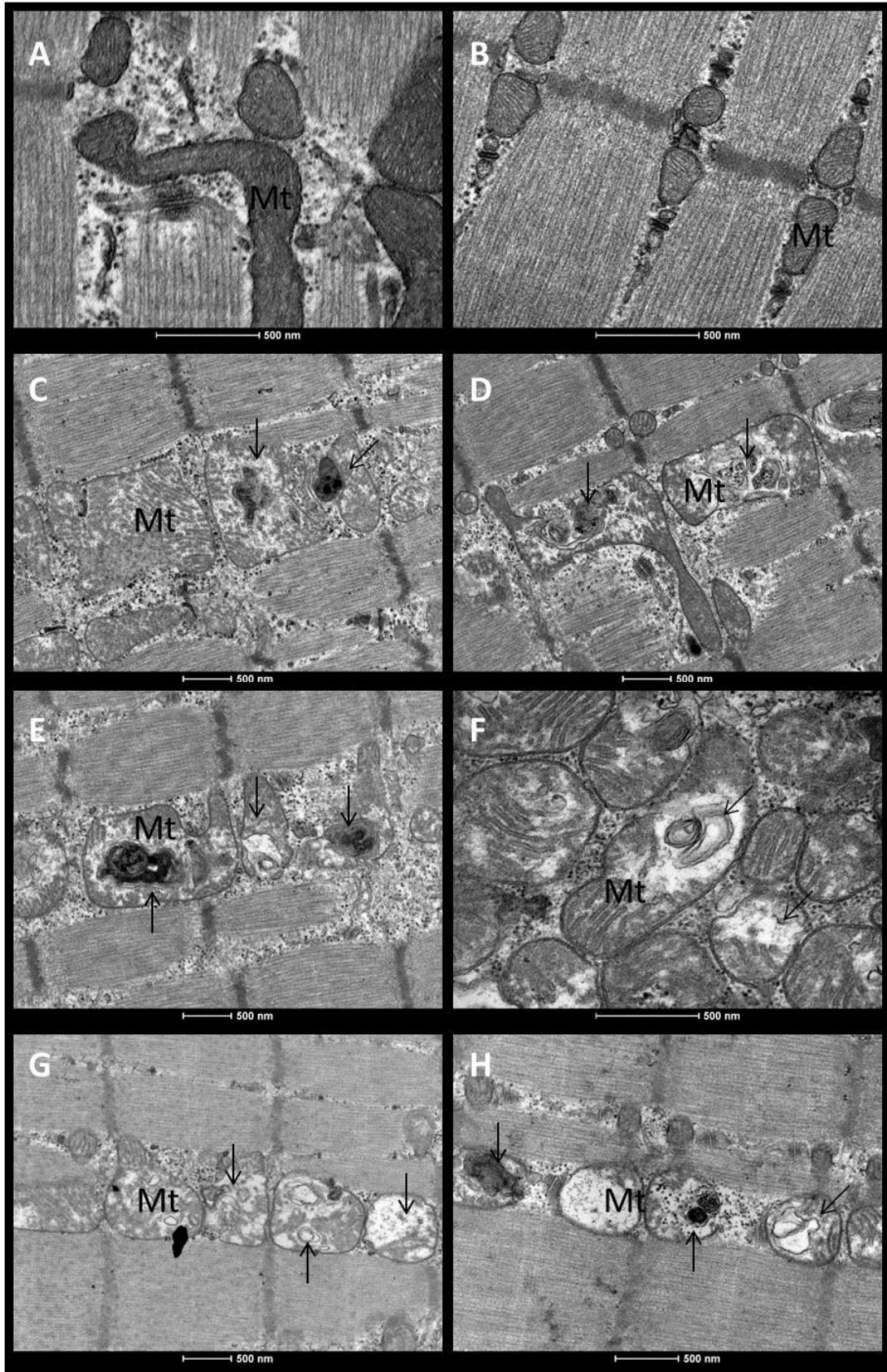


Figura 26: Ultramicrografias das principais alterações mitocondriais visualizadas ao microscópio eletrônico de transmissão. Mt (mitocôndrias). A) e B) Mitocôndrias normais. C) a H) Mitocôndrias alteradas. As setas apontam algumas alterações encontradas. Magnificação: 23.000x (C, D, E, G, H) e 49.000x (A, B, F).

4.8.2 Perfil de miofibrilas

4.8.2.1 Efeito do exercício em esteira

O exercício em esteira não gerou efeitos sobre a porcentagem relativa de miofibrilas no músculo sóleo (**Figura 27**).

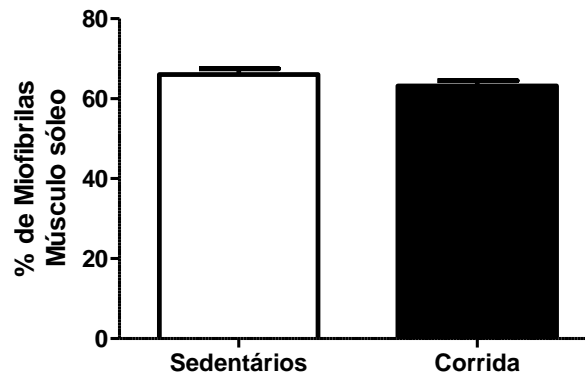


Figura 27 Efeito do exercício sobre a porcentagem relativa de miofibrilas no músculo sóleo. Não houve diferença entre os grupos experimentais. Teste t não pareado.

4.8.2.2 Efeito da infusão intranasal de MPTP

No grupo de animais sedentários (Salina e MPTP), não houve diferença na porcentagem relativa de miofibrilas no músculo sóleo. Já nos animais submetidos ao treinamento em esteira, a infusão de MPTP provocou aumento de miofibrilas ($p < 0,001$) (**Figura 28**).

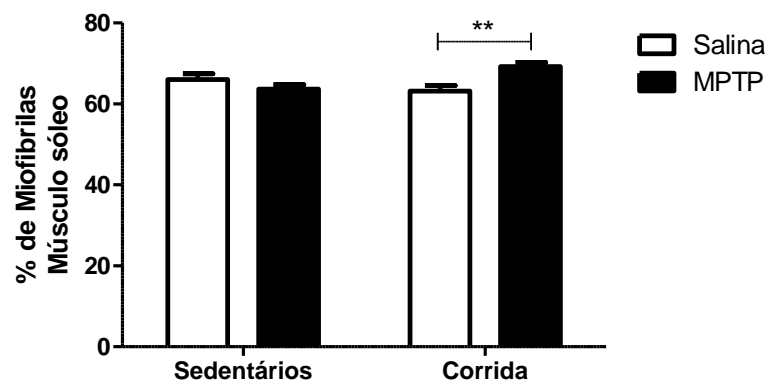


Figura 28: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre a porcentagem relativa de miofibrilas no músculo sóleo. Os animais CMPTP apresentaram aumento na porcentagem de miofibrilas. Teste t não pareado.

4.8.3 Tríades (Túbulos T e retículo sarcoplasmático)

4.8.3.1 Efeito do exercício em esteira

Os animais treinados, quando comparados aos sedentários, apresentaram aumento na porcentagem relativa de tríades no músculo sóleo ($p < 0,001$). A **figura 29**, a seguir, resume esse resultado.

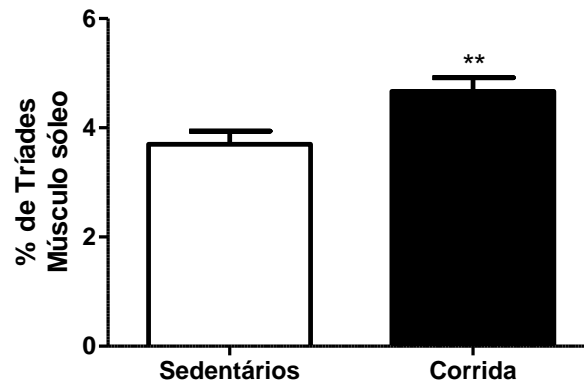


Figura 29: Efeito do exercício em esteira sobre a porcentagem relativa de tríades no músculo sóleo. O exercício promoveu aumento de tríades. Teste t não pareado.

4.8.3.2 Efeito da infusão intranasal de MPTP

Os animais treinados submetidos a infusão de MPTP apresentaram menor porcentagem relativa ($p < 0,001$) de tríades (túbulos T e retículo sarcoplasmático), no músculo sóleo, quando comparados àqueles que receberam salina (Figura 30).

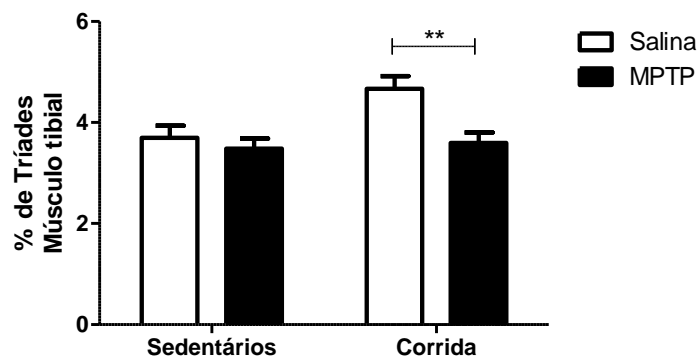


Figura 30: Efeito da infusão intranasal sobre a porcentagem relativa de tríades, túbulos T e retículo sarcoplasmático no músculo sóleo. Os animais treinados que receberam MPTP apresentaram porcentagem mais baixa de tríades em relação aos que receberam salina. Teste Two-way ANOVA.

4.8.4 Sarcoplasma

4.8.4.1 Efeito do exercício em esteira

O exercício em esteira não exerceu influência sobre a porcentagem relativa de sarcoplasma nas células do músculo sóleo (**Figura 31**).

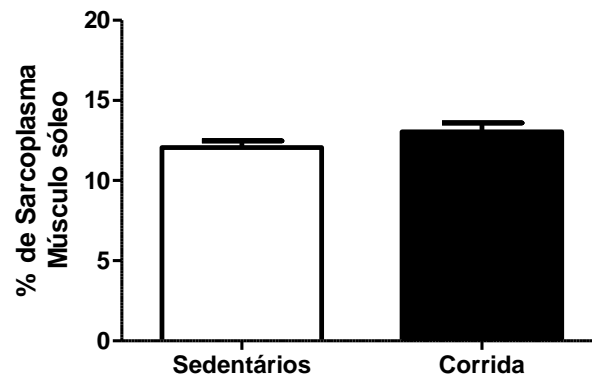


Figura 31: Efeito do exercício em esteira sobre a porcentagem relativa de sarcoplasma no músculo sóleo. Teste t não pareado.

4.8.4.2 Efeito da infusão intranasal de MPTP

A Figura 32 mostra que os ratos sedentários que receberam MPTP apresentaram maior porcentagem relativa ($p < 0,0001$) de sarcoplasma do que aqueles que receberam o veículo salina, nas células do músculo sóleo.

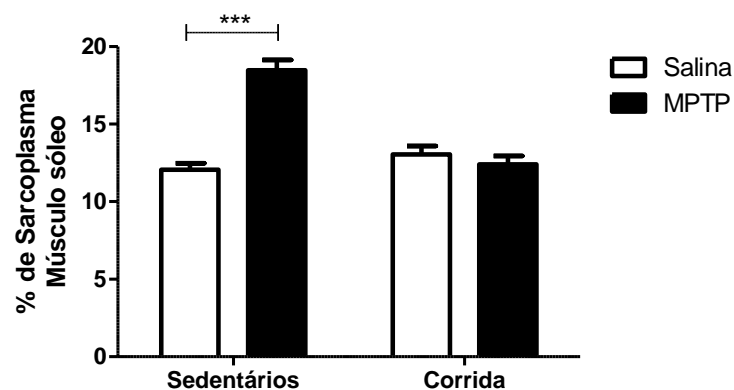


Figura 32: Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre a porcentagem relativa de sarcoplasma no músculo sóleo. Sedentários MPTP apresentaram maior porcentagem de sarcoplasma. Teste Two-way ANOVA.

4.8.5 Outros (vasos, núcleos, células satélite, lipídio)

Outras estruturas como vasos, núcleos, células satélite e gotículas lipídicas, entre outras, foram quantificadas na análise, mas não houve diferença significativa em suas porcentagens relativas em nenhum dos grupos experimentais, causada pelo exercício e/ou pela infusão intranasal de MPTP (dados não apresentados).

4.8.6 Imagens do músculo sóleo obtidas em microscopia eletrônica de transmissão

As **figuras 33 a 36** apresentadas a seguir, constituem ultramicrografias do músculo sóleo. São apresentadas imagens de todos os grupos experimentais utilizados para ilustração das principais características e alterações identificadas pela análise morfométrica.

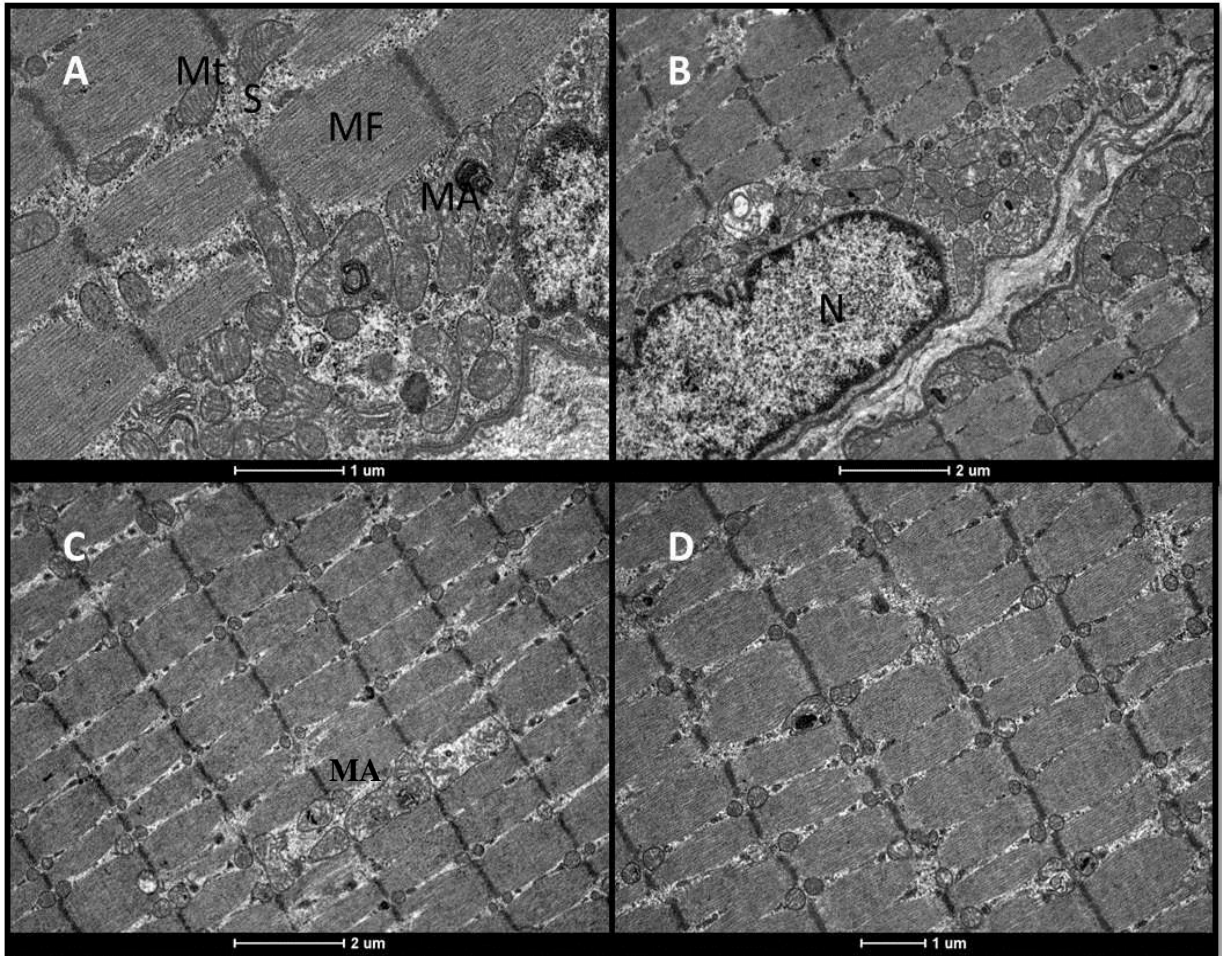


Figura 33: Ultramicrografias de músculo sóleo. Animais sedentários salina. A) 18.500x e B) 9.300x. Imagens da periferia de uma célula muscular. Mt, mitocôndrias. Maior destaque para população de mitocôndrias subsarcolemais, algumas com alterações estruturais (MA). MF = miofibrilas, S = sarcoplasma, N = núcleo. C) e D) 9.300x. Numerosas mitocôndrias intermiofibrilares, algumas apresentando alterações estruturais.

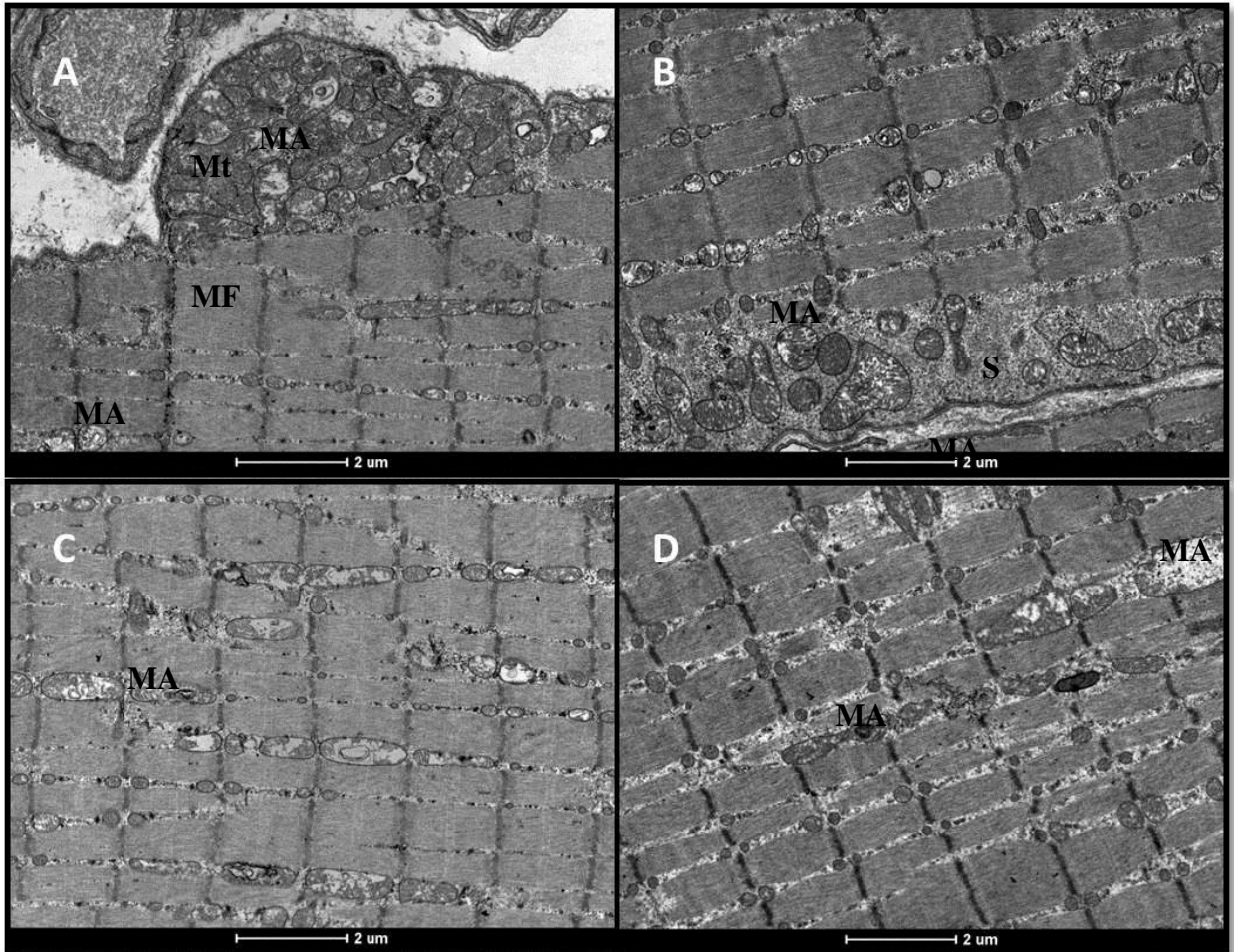


Figura 34: Ultramicrografias de músculo sóleo. Animais sedentários MPTP. Observam-se muitas mitocôndrias alteradas, tanto no espaço sub-sarcolêmico (A e B) quanto nos espaços intermiofibrilares (C e D). Maior abundância de sarcoplasma em relação ao animal não submetido à infusão com salina. Magnificação 9.300x. Mt = mitocôndria, MA = mitocôndria alterada, MF = miofibrila, S = sarcoplasma.

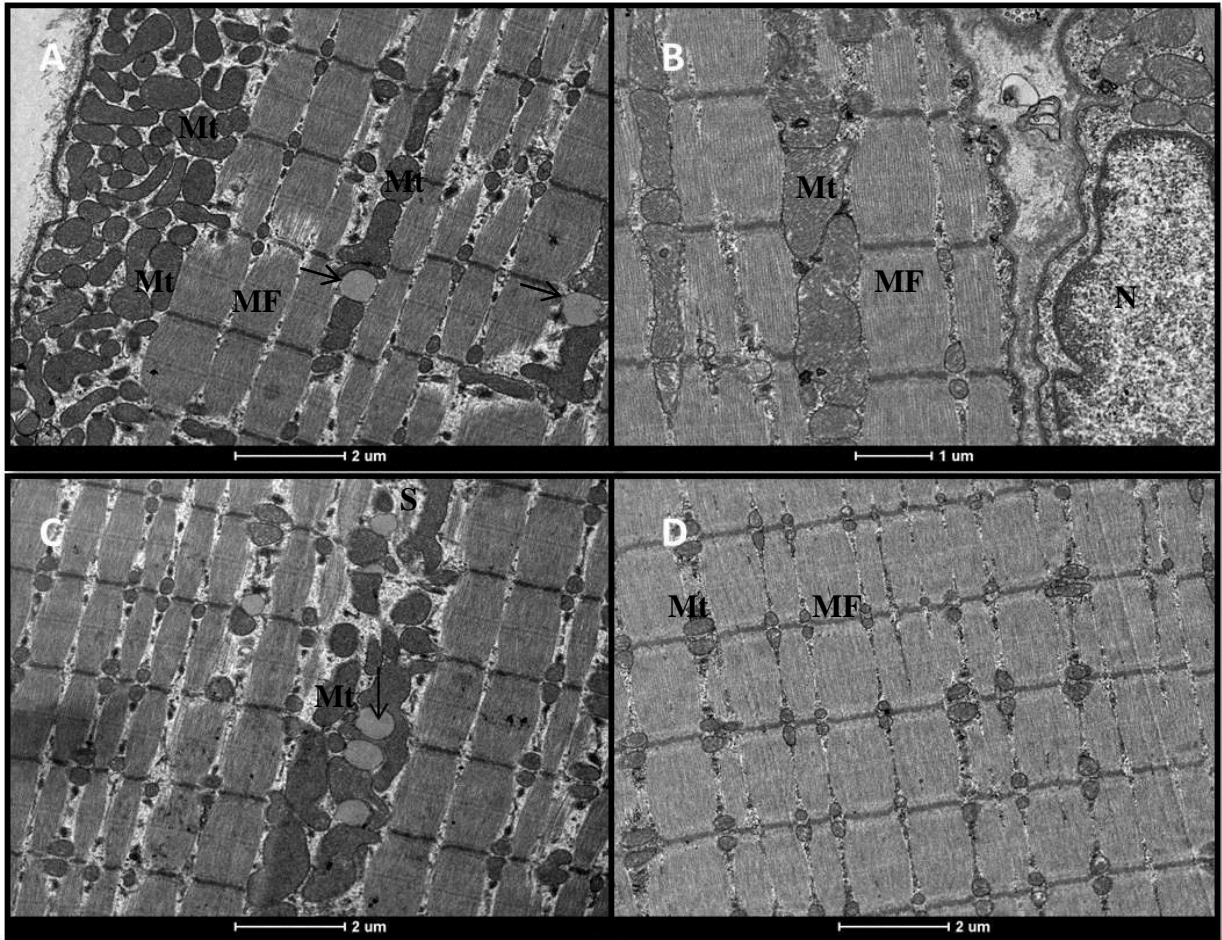


Figura 35: Ultramicrografias de músculo sóleo. Animais treinados submetidos à infusão de salina. Observe mitocôndrias abundantes, com pouca ou nenhuma alteração estrutural. Essas organelas apresentam cristas mais numerosas que os animais sedentários. A seta (↓) indica gotículas lipídicas junto à população de mitocôndrias. A, C e D: magnificação 9.300x. B: 13.000x. Mt = mitocôndria, MF = miofibrilas, S = sarcoplasma, N = núcleo.

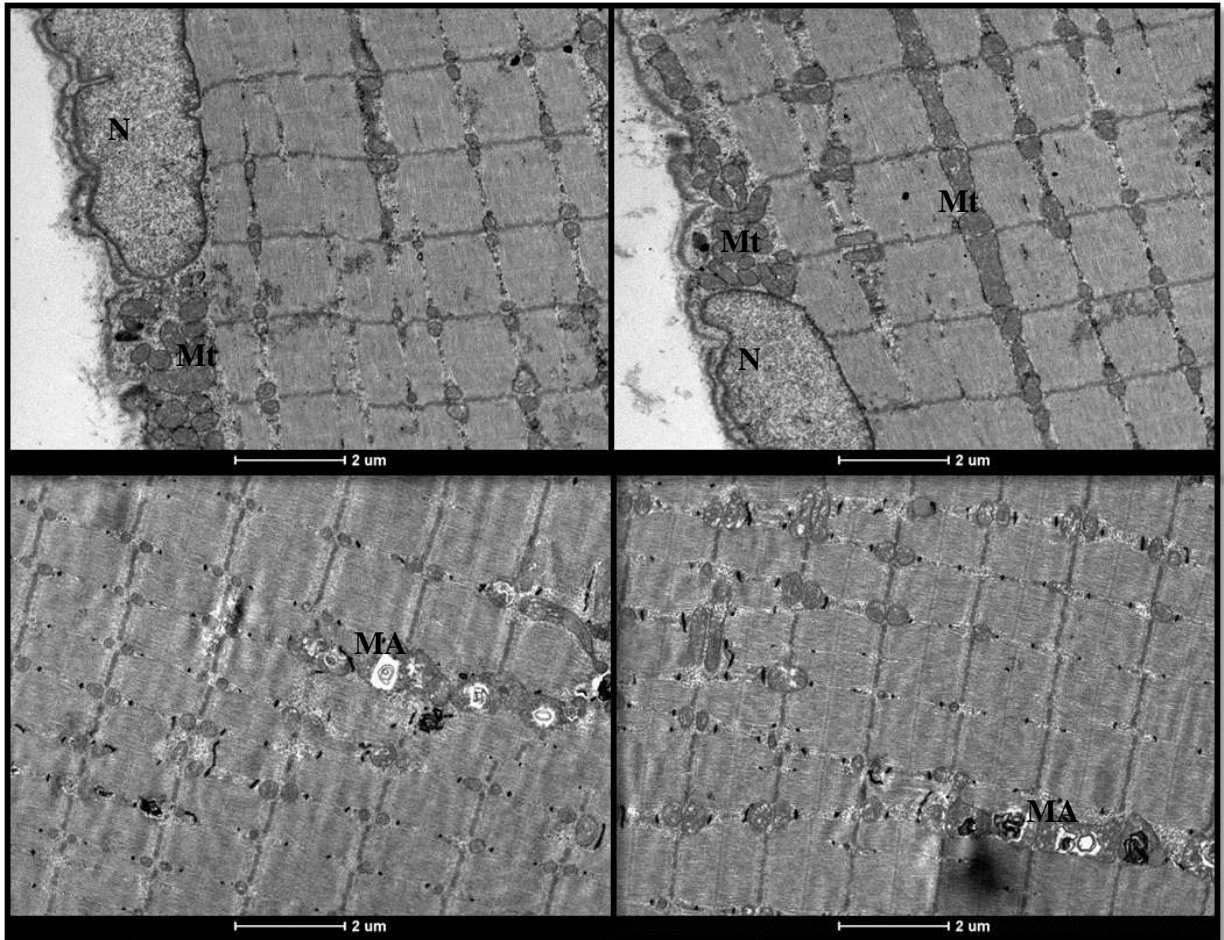


Figura 36: Ultramicrografias de músculo sóleo. Animais treinados submetidos à infusão de MPTP. Observe mitocôndrias abundantes, mas várias com alterações estruturais. Magnificação 9.300x. Mt = mitocôndria, MA = mitocôndrias alteradas, N = núcleo.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Condição física e motora dos animais

Neste trabalho observou-se que o exercício regular em esteira pelo período de 30 dias, promoveu uma melhora da condição física de ratos adultos jovens no período que antecedeu a administração da neurotoxina (entre T1 e T2), no que se refere a velocidade da corrida em esteira, e no aumento do comprimento do passo e da passada observado no teste de análise de marcha. Observou-se ainda aumento da curiosidade exploratória, representada pelo aumento da frequência e duração do comportamento de *rearing*.

As avaliações de desempenho realizadas ao longo do período de treinamento tiveram como objetivo a adaptação da carga de exercício à condição física adquirida pelos animais. A relevância da manutenção da intensidade é suportada pelo fato de que a melhora de parâmetros físicos é proporcional à intensidade do treinamento (KEMI *et al.*, 2005), desse modo uma baixa intensidade pode não gerar alterações na capacidade aeróbica, bem como em parâmetros emocionais e de locomoção (CORDOVA *et al.*, 2013).

A análise de marcha utilizada em nosso projeto é considerada um teste simples de estabilidade postural dinâmica que pode ser aplicado em estudos com animais (METZ *et al.*, 2005). A melhora nos parâmetros comprimento do passo e da passada indicam que o exercício regular em esteira foi capaz de melhorar a estabilidade dinâmica dos animais, sendo esses resultados coerentes com estudos realizados com humanos (CAKIT *et al.*, 2007; PROTAS *et al.*, 2005; HERMAN *et al.*, 2007) que demonstraram melhora na estabilidade postural e velocidade de caminhada adquiridos com treinamento regular em esteira. Estudos de GRILLNER *et al.*, (2008) e GRILLNER (2006) indicam que a repetição de movimentos durante a locomoção reforça a estrutura sináptica de neurônios dos núcleos da base, que se refletem na melhora dos parâmetros analisados. No teste de campo aberto, não foram observadas diferenças significativas na quantidade de ambulação entre animais sedentários e treinados, entretanto, o exercício promoveu aumento do comportamento de *rearing*, em frequência e duração. RIBEIRO (2013) associa o aumento desse comportamento em animais exercitados ao fortalecimento da musculatura do tronco dos roedores, facilitando comportamento de exploração vertical.

Analisando-se o período que se sucede à administração do MPTP, em nosso estudo, observamos que a neurotoxina não prejudicou a *performance* dos animais em esteira, já que o desempenho foi equiparável ao dos animais que receberam salina. Os dois subgrupos não apresentaram melhora significativa na *performance*, mantendo a condição aeróbica estável, e portanto ajustada à carga utilizada.

Após infusão de MPTP, não se observou diferença significativa no peso corporal entre os diferentes grupos experimentais – sedentários ou corrida. O mesmo foi observado para os parâmetros avaliados pelo teste de impressão de pata. No teste de campo aberto, no entanto, observou-se que apenas o grupo sedentário mostrou aumento da distância total percorrida, da velocidade média e do tempo gasto na região central do aparato do teste, aos 21 dias mas não aos 30 dias após infusão de MPTP. O aumento da ambulação bem como diminuição do comportamento de tigmotaxia – um comportamento natural de roedores de andar próximo a paredes – com maior exploração da região central da arena, são alterações associadas a aumento de ansiedade. A hipercinesia observada, e também relatada em outros trabalhos com neurotoxinas parkinsonianas (BRAGA, 2005; PERRY *et al.*, 2005; MORAIS, 2011), pode estar relacionado a mecanismos compensatórios de produção de dopamina pelos neurônios remanescentes, bem como de aumento de receptores pós sinápticos, em resposta à perda de neurônios dopaminérgicos na SN causada pelo MPTP. Essas diferenças de atividade no teste de campo aberto não foram observadas nos animais submetidos ao treinamento em esteira, o que pode indicar que o exercício pode ter exercido influência positiva sobre o processo de perda neuronal e/ou respostas compensatórias.

Nossos resultados apontam que a infusão intranasal de MPTP não foi capaz de gerar alterações motoras grosseiras ou hipocinesia que pudessem ser detectáveis pelos testes utilizados. A utilização de testes adicionais como *rotarod*, trave de equilíbrio transversal (*beam balance test*) e grade vertical (*hanging time/ grid test*) poderiam dar informações mais precisas sobre a condição motora geral dos animais (KARL *et al.*, 2003), complementando nossas observações. Os achados, neste estudo, são compatíveis com os do modelo de infusão intranasal proposto por Prediger que gera, em ratos, cerca de 30-40% de perda de neurônios dopaminérgicos nigrais. Essa perda é considerada moderada e insuficiente para reprodução de sintomas motores importantes, como observados em estágios avançados da doença, tornando o modelo adequado a estudos para reprodução dos estágios pré-clínicos da doença.

5.2 Níveis de fatores neurotróficos

Neste trabalho, o exercício físico em esteira realizado durante o período experimental gerou redução significativa nos níveis séricos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), mas não do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF). Nos músculos sóleo e tibial, os níveis dos dois fatores neurotróficos mantiveram-se inalterados. Todos os resultados foram comparados com os de animais sedentários.

Vários estudos demonstram que breves períodos de exercício moderado podem aumentar transitoriamente a concentração sérica de BDNF em humanos (GOLD *et al.*, 2003; ROJAS-VEGA *et al.*, 2006; TANG *et al.*, 2008). Os níveis parecem retornar aos valores de repouso de 30 a 50 min após o término do exercício (GOLD *et al.*, 2003; TANG *et al.*, 2008). Por outro lado, há estudos que mostram que esses níveis podem cair abaixo dos valores basais de 2 a 3 horas após o exercício (CASTELLANO; WHITE, 2008). O tipo de programa de exercício pode ser um fator decisivo para alterar os níveis periféricos de BDNF (CORREIA *et al.*, 2010). Ademais, o cérebro pode ser o maior contribuinte para os níveis circulantes após exercício (RASMUSSEN *et al.*, 2009). Um estudo de KAREGE e colaboradores (2005) mostrou uma correlação positiva entre os níveis séricos e corticais de BDNF em ratos, fornecendo evidências que níveis séricos podem refletir níveis no SNC em pelo menos algumas espécies e circunstâncias.

Aumentos transitórios de BDNF sérico em resposta a picos de exercício são postulados como sendo o principal mecanismo para a relação entre atividade física e saúde neural (FERRIS *et al.*, 2007). Entretanto, a relação entre *fitness* cardio-respiratório, hábitos de exercício físico duradouro e níveis basais de BDNF ainda não são claros. NOFUJI e colaboradores (2008) demonstraram uma relação inversa entre a concentração sérica de BDNF e atividade diária - medida pela contagem de passos e gasto de energia - em homens. CURRIE e colaboradores (2009), em trabalho complementar àquele, avaliaram a relação entre o consumo máximo de oxigênio (VO₂ máximo estimado), atividade física de longo prazo, e níveis basais de BDNF no soro humano. Seu trabalho demonstrou relação inversa significativa entre BDNF sérico e VO₂ máximo e correlação positiva entre a concentração de BDNF e frequência cardíaca em repouso. O trabalho de Currie e colaboradores, 2009, foi o primeiro a demonstrar relação inversa entre uma estimativa fisiológica de *performance* cardio-respiratória e concentração sérica de BDNF.

Os resultados encontrados em nosso projeto são condizentes com os de Nofuji e Currie, já que o programa de exercício em esteira mais duradouro (9 semanas) gerou redução nos níveis séricos de BDNF. A redução dos níveis desse fator em indivíduos mais ativos, no entanto, não é bem compreendida. Admite-se que níveis reduzidos, nessa condição, poderiam refletir captação mais eficiente pelo sistema nervoso central, promovendo a função neuronal (CURRIE *et al.*, 2009). Outra função especulada é a de que o BDNF circulante possa ser usado para reparo de dano muscular induzido pelo exercício (NOFUJI *et al.*, 2012). Essas hipóteses são reforçadas por estudos que mostram a superregulação do receptor TrkB (tirosina quinase B) em tecidos periféricos, em resposta ao exercício. Estudos prévios demonstraram que o treinamento físico é capaz de aumentar a expressão de TrkB na medula espinhal, cérebro e músculo sóleo (GÓMEZ-PINNILA *et al.*, 2002) em ratos. Embora não haja estudos diretos demonstrando que o BDNF circulante aja diretamente no reparo de dano induzido por exercício, o tratamento com BDNF suprime a liberação de prostaglandina E2 e creatina quinase, que são indicadores de dano muscular em ratos expostos a estresse oxidativo *in vivo* (LIAN *et al.*, 1998). Camundongos *knock-out* para BDNF muscular apresentam regeneração muscular atrasada, sugerindo que o BDNF tenha importante função na regeneração das fibras (CLOW; JASMIN, 2010).

O significado funcional das neurotrofinas produzidas pelo músculo esquelético em adaptação ao exercício é pouco compreendido. MATTHEWS e colaboradores (2009) demonstram que, 24h após o exercício, os níveis de BDNF musculares não se correlacionam aos níveis circulantes o que indica que o fator possa trabalhar de forma autócrina e/ou parácrina dentro do músculo, não contribuindo, dessa forma, para os níveis periféricos. O seu aumento no músculo está relacionado ao aumento da oxidação de gorduras de forma dependente de AMPK (MATTHEWS *et al.*, 2009). Estudos de expressão de BDNF mRNA em sóleo indicam resposta diferenciada de acordo com o tempo de exercício. GÓMEZ-PINILLA e colaboradores (2001), demonstraram que uma única sessão de exercício não foi capaz de aumentar mRNA de BDNF, mas um aumento robusto (310%) foi observado após completar 5 dias de treinamento em esteira. A quantidade de proteína no entanto não sofreu alteração no músculo mas mostrou-se aumentada na medula espinhal. Esse resultado pode indicar a existência de transporte retrógrado de BDNF do músculo para os motoneurônios ou nervo ciático, prevenindo sua degeneração (GÓMEZ-PINILLA *et al.*, 2001). OGBORN; GARDINER (2010), também encontraram expressão aumentada em sóleo no quinto dia, mas não após 10 dias de exercício quando comparados a animais sedentários. Nenhum trabalho

investigou os níveis no músculo tibial. Em músculo gastrocnêmio não houve alteração no padrão de expressão (OGBORN; GARDINER, 2010). No presente trabalho não encontramos diferenças na quantidade da proteína nos músculos sóleo e tibial e uma análise posterior da expressão de mRNA poderia nos dar informações adicionais.

Analisando-se os efeitos da infusão intranasal de MPTP sobre os níveis dos fatores neurotróficos, observamos em nosso trabalho uma redução significativa nos níveis séricos de BDNF nos animais sedentários, mas não nos animais submetidos ao treinamento em esteira. Observou-se o mesmo padrão de resposta desse fator no músculo sóleo, enquanto no tibial, não houve alteração. A administração da neurotoxina não gerou diferenças nos níveis de GDNF no soro e músculo tibial em nenhum dos grupos experimentais. Não foi possível determinar os níveis de GDNF no músculo sóleo.

Estudos demonstram que os níveis séricos de BDNF encontram-se reduzidos em várias doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer (LASKE *et al.*, 2005), Huntington e Parkinson (ZUCCATO & CATTANEO, 2009). Pacientes com depressão e outros distúrbios psiquiátricos também podem apresentar redução nos níveis séricos em relação aos indivíduos controle (KAREGE *et al.*, 2002). Outros estudos sugerem que o BDNF plasmático pode ser um biomarcador para prejuízos de memória e função cognitiva geral em mulheres idosas (KOMULAINEN *et al.*, 2008; PEDERSEN *et al.*, 2009). Outros quadros como obesidade, distúrbios de metabolismo de glicose e lipídio, diabetes mellitus tipo 2 e síndrome metabólica também são associados a baixos níveis do fator (NOFUJI *et al.*, 2012).

Em nosso trabalho a redução nos níveis séricos encontrados em ratos sedentários submetidos à infusão de MPTP, quando comparado ao controle que recebeu salina, é compatível com os resultados encontrados na literatura associando redução da concentração periférica de BDNF à doença de Parkinson em humanos e modelos animais. Essa redução não foi observada nos animais treinados que foram expostos a neurotoxina, resultado este que pode indicar algum efeito benéfico do exercício contra a redução dos níveis circulantes do BDNF.

Observou-se na literatura carência de trabalhos que investiguem alterações musculares associadas à progressão da doença de Parkinson. Até onde sabemos, não há estudo sobre níveis de fatores neurotróficos em músculo esquelético de humanos parkinsonianos e/ou modelos animais da doença. Sendo assim, o presente trabalho é o primeiro que demonstra alteração nos níveis de BDNF em músculo esquelético em modelo neurotóxico da doença,

ainda em fase pré-clínica, ou seja, sem sintomas motores associados. A alteração observada no músculo sóleo de animais sedentários não foi observada nos animais treinados em esteira após administração da toxina. A carência de estudos correlatos e o pouco conhecimento acerca das funções específicas dos fatores neurotróficos no músculo dificultam uma interpretação aprofundada dos resultados bem como a sugestão de possíveis mecanismos envolvidos.

5.3 Ultraestrutura muscular

Neste trabalho o exercício regular em esteira promoveu aumento na frequência de distribuição de mitocôndrias no músculo sóleo. Observou-se melhora na qualidade das mitocôndrias já que a frequência de perfis mitocondriais com alterações estruturais foi significativamente menor nos animais exercitados quando comparados aos sedentários. Observou-se, ainda, diferença significativa nas frequências de distribuição de retículo sarcoplasmático e sistema de túbulos T (tríades) no músculo sóleo, estando aumentados no músculo sóleo em resposta ao exercício em esteira.

A infusão intranasal de MPTP também teve efeito importante sobre a ultraestrutura mitocondrial. Observou-se aumento na frequência de distribuição de mitocôndrias com alterações estruturais nos músculos sóleo tanto de animais sedentários quanto de animais submetidos ao treinamento em esteira.

As adaptações fenotípicas mais estudadas no músculo esquelético ao exercício crônico são vascularização aumentada (angiogênese), transformação de tipo de fibra para fenótipos mais oxidativos, função/conteúdo mitocondriais aumentados. Extensivos esforços têm sido realizados para a busca de entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes que regulam a biogênese mitocondrial, o processo pelo qual novas mitocôndrias são formadas. Esses esforços culminaram com a descoberta do coativador 1alfa de receptor gama ativado por proliferador de peroxisoma (PGC-1 α) e a inauguração da sua função na biogênese mitocondrial induzida por exercício no músculo esquelético. Durante o exercício há, no músculo, um aumento de várias moléculas de sinalização de stress que parecem ser responsáveis, ao menos em parte, pela ativação dos processos envolvidos na biogênese mitocondrial. Esses sinais moleculares incluem níveis elevados de Ca²⁺ citosólico, proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), espécies reativas de oxigênio (ROS) e

possivelmente NAD^+ (RUSSELL *et al.*, 2014). PGC-1 α é amplamente regulada por vias de sinalização de proteínas quinases, entre as quais se destacam AMPK (JAGGER, 2007) e a proteína quinase ativada por mitógeno p38gama (p38gama MAPK). Pelo menos dois sítios de fosforilação de AMPK foram identificados em PGC-1 α . AMPK não apenas a ativa, mas também promove a transcrição do seu gene, controlando desta forma sua expressão e atividade. De fato, AMPK tem sido referido como um grande interruptor metabólico para regulação aguda do metabolismo energético e adaptações ao exercício. Enquanto a adição de novas mitocôndrias induzidas pelo exercício seja de extrema importância, a manutenção de uma população saudável seja de igual ou maior valor. Interessantemente, dados de KRIEGER *et al* (1980) sugerem que o exercício melhora a função das mitocôndrias da porção subsarcolemal. O dano mitocondrial induzido por espécies reativas de oxigênio (ROS) podem levar ao acúmulo de intermediários metabólicos, que por sua vez prejudicam a função mitocondrial desencadeando um ciclo vicioso. Essas mudanças patológicas em última análise impedem a habilidade de a mitocôndria funcionar corretamente. É concebível que a remoção eficiente de mitocôndrias danificadas seja crítica na manutenção geral de função mitocondrial em um tecido ou órgão como o músculo esquelético. Além disso, o acúmulo de mitocôndrias danificadas associadas a um estilo de vida sedentário podem prejudicar as funções contráteis e metabólicas do músculo esquelético (YAN *et al.*, 2013). A regulação desse ciclo de vida mitocondrial, da biogênese de novas organelas até a remoção de mitocôndrias danificadas, em última análise determina a quantidade global, e mais importante, a qualidade e função das mitocôndrias no músculo esquelético, que são determinantes da função metabólica e performance física.

Mitocôndrias são organelas dinâmicas que se deslocam pela célula juntando-se e separando-se quando necessário. Essa junção e separação das mitocôndrias da rede é referida como fusão e fissão, respectivamente, e permite que células saudáveis e metabolicamente ativas formem uma grande rede de mitocôndrias interconectadas para compartilhar componentes (proteínas, substratos, DNA mitocondrial mtDNA) e remoção de regiões não funcionais. Portanto, o balanço entre esses processos e os sinais responsáveis pela sua regulação são de extrema importância para a manutenção da rede mitocondrial. A maquinaria envolvida na dinâmica mitocondrial requer participação de várias proteínas, e o exercício, além de regular os mecanismos de biogênese, coordena os processos de fusão e fissão mitocondrial, também sobre ação principal de PGC-1 α .

Outra etapa crítica para a manutenção da qualidade mitocondrial é a autofagia (ou mitofagia) que, presumivelmente, ocorre seguindo a seleção de mitocôndrias danificadas através dos processos de fusão/fissão. A inibição da autofagia resulta em respiração mitocondrial reduzida em músculo esquelético de camundongo e estresse oxidativo aumentado em cultura de células. O exercício também ajuda a manter a expressão de proteínas autofágicas no processo de envelhecimento e pode até promover a expressão dessas no músculo, mediando os efeitos benéficos do exercício. Neste contexto, estudos apontam que a autofagia é induzida por exercício agudo no músculo esquelético (GRUMATI *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2012; OGURA *et al.*, 2011) e outros tecidos periféricos (GRUMATI *et al.*, 2001; HE *et al.*, 2012). No entanto, os mecanismos regulatórios responsáveis pela autofagia induzida pelo exercício agudo e o papel do exercício em longo prazo sobre esses mecanismos ainda precisam ser determinados. A mitofagia no músculo esquelético tem recebido atenção crescente, especialmente no contexto de atrofia muscular (ROMANELLO *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2009). ROMANELLO e colaboradores (2010) mostraram que programas de atrofia muscular podem ser ativados por rompimento na rede mitocondrial. Pouco se sabe sobre as proteínas-chave envolvidas nos sinais requeridos para regulação dos níveis basais de autofagia mitocondrial. Estudos com modelos animais para doença neurais, indica que Parkina e Pink 1 parecem transmitir sinais associados ao dano mitocondrial para indução de mitofagia (NARENDRA *et al.*, 2010).

Finalmente duas vias induzidas por exercício, AMPK, o principal interruptor metabólico, e o alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), uma via relacionada a indução de hipertrofia, foram mostradas como tendo importantes funções na regulação autofágica. Em conjunto com a natureza geralmente oposta de AMPK e mTOR, evidências anteriores apoiam que a ativação de AMPK induz fosforilação estimulatória de Ulk1 para indução de autofagia, enquanto mTOR resulta na fosforilação inibitória de Ulk1 (EGAN *et al.*, 2011). Como essas quinases são diferentemente reguladas dependendo do modo e intensidade do exercício, elas podem ajudar no ajuste fino da mitofagia seguindo o exercício e como adaptação ao treinamento. Entretanto, seu papel específico na autofagia de músculo esquelético não foi explorado.

Nossos resultados apontam a melhora de função metabólica e performance muscular, representado pelo aumento global de mitocôndrias no músculo, bem como melhora de qualidade dessas organelas. Resta investigar se esses processos resultam do balanço dos mecanismos de biogênese, fusão/fissão e mitofagia.

Doenças mitocondriais geralmente se manifestam no músculo esquelético como resultado de defeitos genéticos na cadeia respiratória por deficiências enzimáticas e alterações estruturais. Além de mutações genéticas, miopatias mitocondriais podem surgir como manifestações secundárias a outras doenças e condições; muitas das quais relacionadas à idade incluindo caquexia por câncer, diabetes tipo 2 e sarcopenia. Desordens neuromusculares, distrofias musculares e doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer e Huntington geralmente apresentam funcionalidade mitocondrial reduzida no músculo. Atividades reduzidas no complexo I mitocondrial e, com menor frequência nos complexos II, III e IV foram detectadas em músculo esquelético de indivíduos com Parkinson. AHLQVIST e LANDIN (1975), em um dos raros trabalhos que investigaram alterações musculares em indivíduos parkinsonianos, identificaram atrofia muscular e alterações ultraestruturais em mitocôndrias como, por exemplo, perda da membrana interna, além de redução na atividade da enzima succinato desidrogenase (SDH) e da capacidade oxidativa muscular. Outras desordens neuromusculares e distrofias relacionadas a miopatias mitocondriais incluem distrofias de colágeno tipo VI, distrofia muscular de Duchenne (DMD) e a doença de neurônios motores - esclerose lateral amiotrófica (ELA). Atrofia muscular por desuso prolongado em pacientes acamados, astronautas em vôos espaciais, denervação e ventilação mecânica podem também levar a disfunções mitocondriais. Miopatias mitocondriais podem ainda ser causadas por alterações nutricionais tais como deficiência em vitamina D ou efeitos colaterais de uso prolongado de estatinas (RUSSELL *et al.*, 2014).

Sabe-se que um evento de contração muscular é dependente de mecanismos que associam: 1) geração de um estímulo elétrico pelo neurônio motor e propagação desse estímulo simultaneamente para toda a fibra, através do sistema de túbulos T; 2) conversão do estímulo elétrico em um transiente de Ca^{2+} , pela associação do sistema T a retículos sarcoplasmáticos, formando as unidades liberadoras de cálcio (ULC) ou tríades; 3) disponibilidade de ATP e íons Ca^{2+} , requeridos para ativação dos filamentos contráteis do sarcômero, e controle dinâmico rigoroso da disponibilidade desses fatores. Esse controle é otimizado pela proximidade física entre as unidade liberadoras de cálcio ou tríades e mitocôndrias, o que gera uma relação estável e bidirecional entre essas duas organelas, para controle local de integração entre liberação-captção de cálcio e a utilização de ATP durante a contração. Defeitos nesse mecanismo provavelmente resultam em alterações no controle apropriado de dinâmica e uso de ATP e de Ca^{2+} , afetando a homeostase desse íon e estado redox da célula muscular que podem contribuir para disfunção muscular (DIRKSEN, 2009).

Considerando-se a íntima relação entre as tríades e mitocôndrias, é possível que as alterações observadas na porcentagem de distribuição dessas organelas estejam relacionadas, no entanto os significados biológicos dessas alterações são de difícil compreensão sendo necessários mais estudos para interpretação adequada.

No presente trabalho a infusão intranasal de MPTP gerou alterações mitocondriais significativas em músculo esquelético de ratos, representadas pelo prejuízo na qualidade dessas organelas, independentemente do aparecimento de sintomas motores grosseiros. Tais achados indicam que alterações metabólicas musculares podem anteceder e posteriormente acompanhar a progressão dos sintomas motores em estágios mais avançados da doença. Alterações nos níveis de BDNF musculares devem ser considerados na interpretação dos resultados obtidos já que estudos apontam que ativação dos receptores TrkB por esse fator neurotrófico está intimamente relacionado à atividade de AMPK (WIEDEMANN *et al.*, 2006), este considerado o grande interruptor metabólico associado à regulação mitocondrial e outros processos de adaptação metabólica no músculo.

Hipotetizamos que alterações no padrão de ativação muscular podem ocorrer em resposta à morte de neurônios dopaminérgicos causada pelo MPTP, gerando respostas celulares específicas de adaptação ou desregulação dos mecanismos adaptativos à atividade contrátil, o que poderia justificar as alterações encontradas no presente trabalho. No entanto mais estudos são necessários para identificar os fatores envolvidos e compreender de modo mais preciso as vias de sinalização e a transcrição em cada tipo muscular. Considerando-se o pouco conhecimento atual sobre as respostas celulares específicas nos diferentes tipos musculares a estímulos externos e somando esse contexto à carência de trabalhos que investigam os mecanismos musculares envolvidos na progressão dos sintomas motores da doença de Parkinson, concluem-se como desafiadores os resultados aqui obtidos, sendo necessários muitos estudos adicionais para uma interpretação mais aprofundada do trabalho. Julga-se necessária a investigação, no modelo utilizado, de possíveis efeitos sistêmicos do MPTP sobre os tecidos analisados o que poderia influenciar na interpretação dos resultados obtidos.

Embora existam limitações, o presente trabalho pode ser considerado relevante, sobretudo pela carência de trabalhos correlatos, pois é o primeiro a demonstrar a existência de alterações musculares em modelo pré-clínico de Doença de Parkinson por infusão intranasal de MPTP em ratos.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Considerando-se os resultados obtidos nesse estudo, que teve como objetivo investigar a existência de alterações estruturais e nos níveis de fatores neurotróficos em músculo esquelético de ratos submetidos à neurotoxina MPTP, bem como avaliar o efeito do exercício regular sobre essas alterações, concluímos que:

- 1) A infusão intranasal de MPTP não foi capaz de gerar déficits motores importantes nos grupos experimentais;
- 2) Esses resultados reforçam a utilização desse modelo como pré-clínico, ou seja, mimetiza estágios iniciais da doença onde ainda não há déficit motor;
- 3) O exercício crônico reduz os níveis circulantes de BDNF, e essa redução pode estar associada à prevenção/reparação de danos teciduais provocados pelo exercício.
- 4) A infusão intranasal de MPTP gera redução nos níveis séricos e musculares de BDNF em animais sedentários, mas não em animais submetidos ao treinamento regular em esteira.
- 5) O aumento do conteúdo e qualidade de mitocôndrias no músculo em resposta ao exercício crônico indica que houve aumento da capacidade metabólica muscular. É provável que esse resultado se correlacione com o de BDNF já que este é capaz de ativar vias de regulação mitocondrial e outras adaptações ao exercício.
- 6) A infusão intranasal da neurotoxina resultou em piora da qualidade mitocondrial no músculo esquelético, indicando redução na capacidade oxidativa muscular. O exercício não foi capaz de proteger contra essas alterações no músculo.

Os resultados encontrados, embora limitados quanto a sua abrangência, nos fornecem boas perspectivas para estudos posteriores, uma vez que até o momento não há outros trabalhos que tenham demonstrado alterações musculares que antecedessem os sintomas motores em modelo animal de doença de Parkinson.

Sugestões para estudos posteriores incluem a investigação de alterações na junção neuromuscular, bem como os níveis de fatores neurotróficos e presença de alterações em neurônios motores do corno anterior da medula espinhal. Estudos de expressão de proteínas envolvidas no processo de adaptação metabólica à estímulos de excitação/contração muscular poderiam ainda fornecer informações adicionais sobre os mecanismos moleculares envolvidos

nas respostas celulares específicas do modelo bem como contribuir para melhor entendimento das vias de sinalização dependentes do tipo de fibra muscular. É importante ressaltar que o músculo esquelético tem sido intensivamente estudado nos últimos anos devido a seu importante papel de regulação da homeostase metabólica dependente de contração, sendo considerado o principal mediador dos efeitos benéficos do exercício físico diante de vários quadros patológicos, o que inclui a doença de Parkinson.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLQVIST, G.; LANDIN, S. Ultrastructure of Skeletal Muscle in Patients with Parkinson ' s Disease and Upper Motor Lesions. **Laboratory Investigation**, v. 32, n. 5, p. 673-679, 1975.
- ALTER, S. P.; LENZI, G. M.; BERNSTEIN, A. I.; MILLER, G. W. Vesicular integrity in Parkinson's disease. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 13, n. 7, p. 362, jul 2013.
- AYTON, S.; GEORGE, J. L.; ADLARD, P. A; *et al.* The effect of dopamine on MPTP-induced rotarod disability. **Neuroscience letters**, v. 543, p. 105–9, 24 maio 2013.
- AZNAVOUR, N.; CENDRES-BOZZI, C.; LEMOINE, L.; *et al.* MPTP animal model of Parkinsonism: dopamine cell death or only tyrosine hydroxylase impairment? A study using PET imaging, autoradiography, and immunohistochemistry in the cat. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 18, n. 11, p. 934–41, nov 2012.
- BALTHAZAR, C. H.; LEITE, L. R. H.; RODRIGUES, A. G. & COIMBRA, C. C. Performance-enhancing and thermoregulatory effects of intracerebroventricular dopamine in running rats. **Pharmacology, biochemistry and behavior**, v. 93, n. 4, p. 465-469, 2009.
- BANIK, N. L. Parkinson ' s disease : Quest for effective therapeutic strategies. **Journal of Neurochemistry**, v. 118, n. 3, p. 326–338, 2011.
- BAQUET, Z. C.; BICKFORD, P. C.; JONES, K. R. Brain-derived neurotrophic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. **The Journal of neuroscience**, v. 25, n. 26, p. 6251–9, 29 jun 2005.
- BARNETT, E.M.; PERLMAN, S. The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. **Virology**, v. 194, n.1, p. 185-191, maio 1993.
- BAZZU, G.; CALIA, G.; PUGGIONI, G.; *et al.* -Synuclein- and MPTP-Generated Rodent Models of Parkinson ' s Disease and the Study of Extracellular Striatal Dopamine Dynamics : A Microdialysis Approach. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 9, p. 482–490, 2010.
- BERGEN, J.L.; TOOLE, T.; ELLIOTT, R.G.; WALLACE, B.; ROBINSON, K.; MAITLAND, C.G. Aerobic exercise intervention improves aerobic capacity and movement initiation in Parkinson's disease patients. **NeuroRehabilitation**, v. 17, p. 161–168, 2002.
- BLANDINI, F. Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of neuroimmune pharmacology** :, v. 8, n. 1, p. 189–201, mar 2013.

- BLESA, J.; PHANI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Classic and New Animal Models of Parkinson ' s Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-10, 2012.
- BOGER, H. A; MIDDAUGH, L. D.; HUANG, P.; *et al.* A partial GDNF depletion leads to earlier age-related deterioration of motor function and tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra. **Experimental neurology**, v. 202, n. 2, p. 336–47, dez 2006.
- BRAAK, H.; BOHL, J. R.; MÜLLER, C. M.; *et al.* Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson ' s disease reconsidered. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 21, n. 12, p. 2042–51, dez 2006.
- BRAGA, A. R. **Efeitos da Parecoxib - um inibidor da COX2 - no modelo de parkinsonismo induzido por MPTP em ratos.** 2005. 60 fls. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- BURKE, R. E. Evaluation of the Braak staging scheme for Parkinson ' s disease: introduction to a panel presentation. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 25 Suppl 1, p. S76–7, jan 2010.
- CAKIT, B.D.; SARACOGLU, M.; GENÇ, H.; ERDEM, H.R.; INAN, L. The effects of incremental speed-dependent treadmill training on postural instability and fear of falling in Parkinson's disease. **Clinical Rehabilitation**, v. 21, n. 8, p. 698-705, ago 2007.
- CAMILETTI-MOIRÓN, D.; APARICIO, V. A; ARANDA, P.; RADAK, Z. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 23, n. 4, p. e202–12, ago 2013.
- CASA-FAGES, B. DE; GRANDAS, F.; PHENOMENOLOGY, S. Dopamine Dysregulation Syndrome and Deep Brain Stimulation of the Subthalamic Nucleus in Parkinson ' s Disease. **Neurology Research International**, v. 2011, 2011.
- CASTELLANO, V.; WHITE, L.J. Serum brain-derived neurotrophic factor response to aerobic exercise in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Science**, v. 269, n. 1–2, p. 85-91, jun 2008.
- CASTRO, A. A; GHISONI, K.; LATINI, A.; *et al.* Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson ' s disease. **Behavioural brain research**, v. 229, n. 1, p. 208–15, 1 abr 2012.
- CLOW, C.; JASMIN, B. J. Brain-derived Neurotrophic Factor Regulates Satellite Cell Differentiation and Skelatal Muscle Regeneration. **Molecular Biology of the Cell**, v. 21, p. 2182–2190, 2010.
- CONNOR, B.; YOUNG, D.; YAN, Q.; FAULL, R.L.; SYNEK, B.; DRAGUNOW, M. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer ' s disease. **Molecular Brain Research**, v. 49, n. 1–2, p. 71-81, out 1997.

- COOK, C.; STETLER, C.; PETRUCELLI, L. Disruption of Protein Quality Control in Parkinson's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. 1–17, 2012.
- CÓRDOVA, S. D.; LOSS, C. M.; DE OLIVEIRA, D. L. Low-intensity physical training recovers object recognition memory impairment in rats after early-life induced Status epilepticus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 196–201, mai 2013.
- CORREIA, P. R.; PANSANI, A.; MACHADO, F.; *et al.* Acute strength exercise and the involvement of small or large muscle mass on plasma brain-derived neurotrophic factor levels. **Clinics**, v. 65, n. 11, p. 1123–1126, 2010.
- CRUZ, L.H.C. **Exercício forçado e prévio à lesão melhora parâmetros motores e produção de fatores neurotróficos em modelo experimental da doença de Parkinson**. 2012. 127 fls. Tese (Doutorado em Neurociências) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- CUI, M.; ARAS, R.; CHRISTIAN, WV.; *et al.*, “The organic cation transporter-3 is a pivotal modulator of neurodegeneration in the nigrostriatal dopaminergic pathway,” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 106, no. 19, pp. 8043–8048, 2009.
- CURRIE, J.; RAMSBOTTOM, R.; LUDLOW, H.; NEVILL, A.; GILDER, M. Cardio-respiratory fitness, habitual physical activity and serum brain derived neurotrophic factor (BDNF) in men and women. **Neuroscience letters**, v. 451, n. 2, p. 152–5, 20 fev 2009.
- DEHAY, B.; MARTINEZ-VICENTE, M.; CALDWELL, G. A.; *et al.* Lysosomal impairment in Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 28, n. 6, p. 725–32, jun 2013.
- DIRKSEN, R. T. Coupling in Skeletal Muscle. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 389–395, 2009.
- DOTY, R.L. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? **Annals of Neurology**, v. 63, n. 1, p. 7–15, jan 2008.
- DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E.; HOULE, J.D.; DENNIS, R.A.; ZHANG, J.; KNOX, M.; WAGONER, G. Exercise-induced gene expression in soleus muscle is dependent on time after spinal cord injury in rats. **Muscle & Nerve**, v. 29, n.1, p. 73–81, jan 2004.
- DUPUIS, L. Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases. **Biochimie**, p. 1–7, 16 ago 2013.
- EGAN, D.; KIM, J.; SHAW, R.J.; GUAN, K.L. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. **Autophagy**, v. 7, n. 6, p. 643–644, jun 2011.
- FERRIS, L.T.; WILLIAMS, J.S.; SHEN, C.L. The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. **Medicine Science Sports Exercise**, v. 39, n.4, p. 728–734, abril 2007.

- FISHER, B. E.; PETZINGER, G. M.; NIXON, K.; HOGG, E.; BREMMER, S.; MESHUL, C. K.; JAKOWEC, M. W. Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse basal ganglia. **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, n. 3, 378–90, 2004.
- GERECKE, K. M.; JIAO, Y.; PAGALA, V.; SMEYNE, R. J. Exercise does not protect against MPTP-induced neurotoxicity in BDNF haploinsufficient mice. **PLOS One**, v. 7, n. 8, e43250, 2012.
- GLASS, C.K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M.C.; GAGE, F.H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, p. 918–934, 2010.
- GOLD, S.M.; SCHULZ, K.H.; HARTMANN, S.; MLADEK, M.; LANG, U.E.; HELLWEG, R.; *et al.* Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. **Journal of Neuroimmunology**, 2003; v. 138, n.1, p. 99-105, maio 2003.
- GÓMEZ-PINILLA, F.; YING, Z.; OPAZO, P.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. Differential regulation by exercise of BDNF and NT-3 in rat spinal cord and skeletal muscle. **The European journal of neuroscience**, v. 13, n. 6, p. 1078–84, mar 2001.
- GUI, Y.X.; WANG, X.Y.; KANG, W.Y.; ZHANG, Y.J.; ZHANG, Y.; ZHOU, Y.; QUINN, T.J.; LIU, J.; CHEN, S.D. Extracellular signal-regulated kinase is involved in alpha-synuclein-induced mitochondrial dynamic disorders by regulating dynamin-like protein 1. **Neurobiology of Aging**, 2012.
- GRILLNER, S. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. **Neuron**, v. 52, n. 5, p. 751-66, dez 2006.
- GRILLNER, S.; WALLÉN, P.; SAITOH, K.; KOZLOV, A.; ROBERTSON, B. Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates: an overview. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 1, p. 2-12, jan 2008.
- GRUMATI, P.; COLETTI, L.; SCHIAVINATO, A.; CASTAGNARO, S.; BERTAGGIA, E.; SANDRI, M.; BONALDO, P. Physical exercise stimulates autophagy in normal skeletal muscles but is detrimental for Collagen VI-deficient muscles. **Autophagy**, v. 7, n. 12, p. 1415-1423, dez 2011.
- GUNDERSEN, K. Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 86, n. 3, p. 564–600, ago 2011.
- HASTINGS, L.; EVANS, J.E. Olfactory primary neurons as a route of entry for toxic agents into the CNS. **Neurotoxicology**, v. 12, n. 4, p. 707-714, 1991.
- HE, C.; BASSIK, M.C.; MORESI, V., *et al.* Exercise-induced Bcl2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 511-515, jan 2012.

- HERMAN, T.; GILADI, N.; GRUENDLINGER, L.; HAUSDORFF, J.M. Six weeks of intensive treadmill training improves gait and quality of life in patients with Parkinson's disease: a pilot study. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 88, n. 9, p. 1154-8, set 2007.
- HIRSCH, E.C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **Lancet Neurology**, v. 8, p. 382–397, 2009.
- HIRSCH, M.A.; TOOLE, T.; MAITLAND, C.G.; RIDER, R.A. The effects of balance training and high-intensity resistance training on persons with idiopathic Parkinson's disease. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 84, p. 1109–1117, 2003.
- HUANG, E.J.; REICHARDT, L.F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 677–736, 2001.
- HYMAN, C.; HOFER, M.; BARDE, Y.A.; JUHASZ, M.; YANCOPOULOS, G.D.; SQUINTO, S.P.; LINDSAY, R.M. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. **Nature**, v. 350, p. 230–232, 1991.
- JAGER, S.; HANDSCHIN, C.; ST-PIERRE, J.; SPIEGELMAN, B.M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 29, p. 12007-12022, jul 2007.
- JOHNSON, K. A.; CONN, P. J.; NISWENDER, C. M. Glutamate receptor as therapeutic targets for Parkinson's disease. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v.8, n. 6, p. 475-491, dez 2010.
- KAREGE, F.; BONDOLFI, G.; GERVASONI, N.; SCHWALD, M.; AUBRY, J.M.; BERTSCHY, G. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of depressed patients probably results from lowered platelet BDNF release unrelated to platelet reactivity. **Biological Psychiatry**, v. 57, n.9, p. 1068-1072, maio 2005.
- KAREGE, F.; PERRET, G.; BONDOLFI, G.; SCHWALD, M.; BERTSCHY, G.; AUBRY, J.M. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. **Psychiatry Research**, v. 109, n. 2, p. 143–148, mar 2002.
- KARL, T.; PABST, R.; HÖRSTEN, S. VON. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. **Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie**, v. 55, n. 1, p. 69–83, jul 2003.
- KEMI, O. J.; HARAM, P. M.; LOENNECHEN, J. P.; OSNES, J.-B.; SKOMEDAL, T.; WISLØFF, U.; ELLINGSEN, Ø. Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. **Cardiovascular research**, v. 67, n. 1, p. 161–172, jul 2005.
- KOMULAINEN, P.; PEDERSEN, M.; HANNINEN, T.; BRUUNSGAARD, H.; LAKKA, T.A.; KIVIPELTO, M.; HASSINEN, M.; RAURAMAA, T.H.; PEDERSEN, B.K.;

- RAURAMAA, R. BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: The DR's Extra Study. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 90, n. 4, p. 596–603, nov 2008.
- KRIEGER, D.A.; TATE, C.A.; MCMILLIN-WOOD, J.; BOOTH, F.W. Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. **Journal of Applied Physiology**, v. 48, n. 1, p. 23-28, jan 1980.
- LANGSTON, J.W.; BALLARD, P.; TETRUD, J.W.; IRWIN, I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v. 219, p. 979–980, 1983.
- LASKE, C.; STRANSKY, E.; LEYHE, T.; ESCHWEILER, G.W.; WITTORF, A.; RICHARTZ, E.; BARTELS, M.; BUCHKREMER, G.; SCHOTT, K. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 113, n. 9, p. 1217–1224, set 2006.
- LEE, J.; FUKUMOTO, H.; ORNE, J.; KLUCKEN, J.; RAJU, S.; VANDERBURG, C.R.; IRIZARRY, M.C.; HYMAN, B.T.; INGELSSON, M. Decreased levels of BDNF protein in Alzheimer temporal cortex are independent of BDNF polymorphisms. **Experimental Neurology**, v. 194, n. 1, p. 91-96, jul 2005.
- LEITE, L. H. R.; LACERDA, A. C. R.; BALTHAZAR, C. H.; MARUBAYASHI, U. & COIMBRA, C. C. Central angiotensin AT₁ receptors are involved in metabolic adjustments in response to graded exercise in rats. **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1931-1935, 2009.
- LIAN, J.D.; AL-JUMAH, M.; CWIK, V.; BROOKE, M.H. Neurotrophic factors decrease the release of creatine kinase and prostaglandin E2 from metabolically stressed muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 8, n. 1, p. 7-13, fev 1998.
- LIU, B. I. N.; HONG, J. Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases : Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 1, p. 1–7, 2003.
- MATTHEWS, V. B.; ASTRÖM, M.-B.; CHAN, M. H. S.; *et al.* Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. **Diabetologia**, v. 52, n. 7, p. 1409–18, jul 2009.
- METZ, G.A.; TSE, A.; BALLERMANN, M.; SMITH, L.K.; FOUAD, K. The unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease revisited: an electromyographic and behavioural analysis. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 735-44, ago 2005.
- MIYAI, I.; FUJIMOTO, Y.; UEDA, Y.; YAMAMOTO, H.; NOZAKI, S.; SAITO, T.; KANG, J. Treadmill training with body weight support: its effect on Parkinson's disease. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 81, p. 849–852, 2000.

- MORAIS, L.H. **Estudo da alterações comportamentais e neuroquímicas da rotenona como um modelo animal de parkinsonismo.** 2011. 70fls. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- MOSLEY, R.L.; HUTTER-SAUNDERS, J.A.; STONE, D.K.; GENDELMAN, H.E. Inflammation and adaptive immunity in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine** v.2, a009381, 2012.
- NARENDRA, D.P.; JIN, S.S.; TANAKA, A.; SUEN, D.F.; GAUTIER, C.A.; SHEN, J.; COOKSON, M.R.; YOULE, R.J. Pink1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate parkin. **PLOS Biology**, v. 8, n. 1, p. 1-21, jan 2010.
- NARISAWA-SAITO, M.; WAKABAYASHI, K.; TSUJI, S.; TAKAHASHI, H.; NAWA, H. Regional specificity of alterations in NGF, BDNF and NT-3 levels in Alzheimer's disease. **Neuroreport**, v. 7, n. 18, p. 2925-2928, nov 1996.
- NOFUJI, Y.; SUWA, M.; MORIYAMA, Y.; NAKANO, H.; ICHIMIYA, A.; NISHICHI, R.; SASAKI, H.; RADAK, Z.; KUMAGAI, S. Decreased serum-brain derived neurotrophic factor in trained men, **Neuroscience Letters**, v. 437, n. 1, p. 29-32, maio 2008.
- NOFUJI, Y.; SUWA, M.; SASAKI, H.; *et al.* Different circulating brain-derived neurotrophic factor responses to acute exercise between physically active and sedentary subjects. **Journal of sports science & medicine**, v. 11, n. 1, p. 83-8, jan 2012.
- NORMANDIN, L.; ANN BEAUPRE, L.; SALAHI, F.; *et al.* Manganese distribution in the brain and neurobehavioral changes following inhalation exposure of rats to three chemical forms of manganese. **Neurotoxicology**, v. 25, n.3, p. 433-441, mar 2004.
- OBESO, J. A; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; BENITEZ-TEMINO, B.; *et al.* Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 23 Suppl 3, p. S548-59, jan 2008.
- OGBORN, D. I.; GARDINER, P. F. Effects of exercise and muscle type on BDNF, NT-4/5, and TrKB expression in skeletal muscle. **Muscle & nerve**, v. 41, n. 3, p. 385-91, mar 2010.
- OGURA, Y.; IEMITSU, M.; NAITO, H.; KAKIGI, R.; KAKEHASHI, C.; MAEDA, S.; AKEMA, T. Single bout of running exercise changes LC3-II expression in rat cardiac muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 4, p. 756-760, nov 2011.
- PAULA, A.; LOUREIRO, C.; RAQUEL, A.; *et al.* Análise histomorfométrica do músculo sóleo de ratos submetidos ao modelo animal de parkinsonismo induzido pelo MPTP. v. 26, n. 2, p. 395-402, 2013.
- PEDERSEN, B. K.; PEDERSEN, M.; KRABBE, K. S.; *et al.* Role of exercise-induced brain-derived neurotrophic factor production in the regulation of energy homeostasis in mammals. **Experimental physiology**, v. 94, n. 12, p. 1153-60, dez 2009.

- PERRY, C.G.; LALLY, J.; HOLLOWAY, G.P.; HEIGENHAUSER, G.J.; BONEN, A.; SPRIET, L.L. Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 588, n. 23, p. 4795–4810, dez 2010.
- PETZINGER, G. M.; WALSH, J. P.; AKOPIAN, G.; HOGG, E.; ABERNATHY, A.; AREVALO, P.; TURNQUIST, P.; *et al.* Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. **The Journal of neuroscience**, v. 27, n. 20, p. 5291–300, 2007.
- POTHAKOS, K.; NOVIKOVA, L.; SMIRNOVA, I. V; KURZ, M. J. Endurance exercise promotes cardiorespiratory rehabilitation without neurorestoration in the chronic mouse model of parkinsonism with severe neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 149, p. 28–37, 2007.
- PRATESI, A.; TARANTINI, F.; BARI, M. DI. Skeletal muscle: an endocrine organ. **Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases**, v. 10, n. 1, p. 11–4, jan 2013.
- PREDIGER, R.D.S.; AGUIAR JR, A.S.; MATHEUS, F.C.; WALZ, R.; ANTOURY, L.; RAISMAN-VOZARI, R.; DOTY, R.L. Intranasal administration of neurotoxins in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, v.21, p. 90-116, 2012.
- PREDIGER, R. D. S.; AGUIAR, A. S.; ROJAS-MAYORQUIN, A. E.; *et al.* Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, v. 17, n. 2, p. 114–29, fev 2010.
- PROTAS, E.J.; MITCHELL, K.; WILLIAMS, A.; QURESHY, H.; CAROLINE, K.; LAI, EC. Gait and step training to reduce falls in Parkinson's disease. **NeuroRehabilitation**, v. 20, n. 3, p. 183-90, 2005.
- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3–33, fev 2003.
- RASMUSSEN, P.; BRASSARD, P.; ADSER, H.; PEDERSEN, M.V.; LEICK, L.; HART, E.; *et al.* Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. **Experimental Physiology**, V. 94, n. 10, p. 1062-1069, out 2009.
- REALE, M.; IARLORI, C.; THOMAS, A.; *et al.* Brain , Behavior , and Immunity Peripheral cytokines profile in Parkinson ' s disease. **Brain Behavior and Immunity**, v. 23, n. 1, p. 55–63, 2009.
- RIBEIRO, R. M. **Níveis de fatores neurotróficos e citocinas em modelo experimental de parkinsonismo: efeito do exercício físico.** 2013. 131 fls. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

- ROJAS-VEGA, S.; STRÜDER, H.K; WAHRMANN, B.V.; SCHMIDT, A.; BLOCH, W.; HOLLMANN, W. Acute BDNF and cortisol response to low intensity exercise and following ramp incremental exercise to exhaustion in humans. **Brain Research**, v. 1121, n.1, p. 59-65, nov 2006.
- ROMANELLO, V.; GUADAGNIN, E.; GOMES, L.; RODER, I.; *et al.* Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 12, p. 1774–1785, jun 2010.
- RUSSELL, A. P.; FOLETTA, V. C.; SNOW, R. J.; WADLEY, G. D. Skeletal muscle mitochondria: A major player in exercise, health and disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, n. 4, p. 1276–1284, abr 2014.
- SANDERS, L. H.; GREENAMYRE, T., Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. **Free radical biology & medicine**, v. 62, p. 111–20, set 2013.
- SCHAPIRA, A. H. V; GEGG, M. Mitochondrial Contribution to Parkinson ' s Disease Pathogenesis. **Parkinson ' s Disease**, v. 2011, 2011.
- TAJIRI, N.; YASUHARA, T.; SHINGO, T.; KONDO, A.; YUAN, W.; KADOTA, T.; WANG, F.; *et al.* Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. **Brain Research**, v. 1310, 200–7, 2010.
- TAN, Y.L.; ZHOU, D.F; CAO, L.Y.; ZOU, Y.Z.; ZHANG, X.Y. Decreased BDNF in serum of patients with chronic schizophrenia on long-term treatment with antipsychotics. **Neuroscience Letters**, v. 382, n. 1–2, p. 27-32, jul 2005.
- TANG, S.W.; CHU, E.; HUI, T.; HELMESTE, D.; LAW, C. Influence of exercise on serum brain-derived neurotrophic factor concentrations in healthy human subjects. **Neuroscience Letters**, v. 431, n. 1, p. 62-65, jan 2008.
- TJÄLVE, H.; HENRIKSSON, J.; TALLKVIST, J.; LARSSON, B. S.; LINDQUIST, N. G. Uptake of manganese and cadmium from the nasal mucosa into the central nervous system via olfactory pathways in rats. **Pharmacology & Toxicology**, v. 79, n. 6, p. 347-356, dez 1996.
- TUON, T.; VALVASSORI, S.S.; BORGES, J.L.; LUCIANO, T.; TROM, C.B.; SILVA, L.A.; QUEVEDO, J.L.; SOUZA C.T.; LIRA, F.S.; PINHO, R.A. Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 227, p. 305-312, 2012.
- VUCKOVIC, M. G.; FISHER, B.; NACCA, A.; LEAHY, R. M.; WALSH, J.P.; MUKHERJEE, J.; *et al.* Exercise elevates dopamine D2 receptor in a mouse model of Parkinson's disease: in vivo imaging whi (18F)falluptide. **Movement disorders**, v. 25, n. 16, p. 2777-2784, 2010.
- WIEDEMANN, F. R.; SIEMEN, D.; MAWRIN, C.; HORN, T. F.; DIETZMANN, K. The neurotrophin receptor TrkB is colocalized to mitochondrial membranes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 38, n. 4, p. 610–20, jan 2006.

- WU, J.J.; QUIJANO, C.; CHEN, E.; LIU, H.J.; CAO, L.; FERGUSSON, M.M.; ROVIRA; GUTKIND, S.; DANIELS, M.P.; KOMATSU, M.; FINKEL, T. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. **Aging**, v. 1, n. 4, p. 425–437, abr 2009.
- YAN, Z.; LIRA, V. A.; GREENE, N.P. Exercise training-induced regulation of mitochondrial quality. **Exercise and Sports Sciences Reviews**, v. 40, n. 3 p. 159-164, 2012.
- YU, W.; SUN, Y.; GUO, S.; LU, B. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. **Human Molecular Genetics**, v. 20, p. 3227–3240, 2011
- ZATTA, P.; FAVARATO, M.; NICOLINI, M. Deposition of aluminum in brain tissues of rats exposed to inhalation of aluminum acetylacetonate. **NeuroReport**, v. 4, n.9, p. 1119-1122, set 1993.
- ZHANG, XUEJIN; LU, L.; LIU, S.; *et al.* Acetylcholinesterase deficiency decreases apoptosis in dopaminergic neurons in the neurotoxin model of Parkinson's disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 2, p. 265–72, fev 2013.
- ZUCCATO, C.; CATTANEO, E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neurology**, v. 5, n. 6, p. 311–322, jun 2009.

APÊNDICE A – PESO CORPORAL E VELOCIDADE MÁXIMA NA AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO: VALORES AMOSTRAIS (N), MÉDIAS E ERROS MÉDIOS PADRÃO (EMP)

- Variável: **Peso corporal (g)** – Efeito do exercício e da infusão intranasal de MPTP

| | SS | | | SMPTP | | | CS | | | CMPTP | | |
|--------------|---------|-------|--------|---------|-------|--------|---------|-------|--------|---------|-------|--------|
| | Dia -30 | Dia 0 | Dia 30 | Dia -30 | Dia 0 | Dia 30 | Dia -30 | Dia 0 | Dia 30 | Dia -30 | Dia 0 | Dia 30 |
| n | 9 | 9 | 9 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Média | 209,3 | 306,0 | 366,3 | 225,3 | 308,1 | 364,7 | 183,4 | 304,7 | 363,1 | 170,6 | 300,6 | 347,3 |
| EMP | 17,77 | 8,151 | 9,677 | 10,98 | 5,326 | 7,169 | 4,872 | 4,427 | 7,522 | 4,944 | 5,678 | 6,907 |

- Variável: **Velocidade máxima alcançada nas avaliações de desempenho antes da infusão (m/min)** – Efeito do exercício

| | Animais submetidos a treinamento em esteira | | | |
|--------------|---|---------|---------|---------|
| | Dia -35 | Dia -33 | Dia -31 | Dia -15 |
| n | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Média | 26,30 | 26,40 | 26,75 | 29,90 |
| EPM | 0,6329 | 1,099 | 1,023 | 1,033 |

- Variável: **Velocidade máxima alcançada nas avaliações de desempenho após infusão (m/min)** – Efeito da infusão intranasal de MPTP

| | CS | | | CMPTP | | |
|--------------|---------|-------|--------|---------|-------|--------|
| | Dia -15 | Dia 8 | Dia 23 | Dia -15 | Dia 8 | Dia 23 |
| n | 9 | 9 | 9 | 10 | 10 | 10 |
| Média | 30,67 | 28,44 | 29,44 | 29,10 | 28,60 | 28,70 |
| EPM | 1,354 | 1,538 | 1,281 | 1,703 | 1,157 | 0,9667 |

APÊNDICE B – PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DE IMPRESSÃO DA PATA: VALORES AMOSTRAIS (N), MÉDIAS E ERROS MÉDIOS PADRÃO (EMP)

1) Efeito do Exercício em esteira

- Variável: **Largura média da base (cm)**

| | Sedentários | | Corrida | |
|--------------|-------------|---------|---------|--------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 |
| n | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Média | 3,149 | 2,941 | 3,480 | 2,912 |
| EMP | 0,1426 | 0,09555 | 0,09751 | 0,1310 |

- Variável: **Comprimento médio do passo (cm)**

| | Sedentários | | Corrida | |
|--------------|-------------|--------|---------|--------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 |
| n | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Média | 6,673 | 7,181 | 7,129 | 8,291 |
| EMP | 0,1749 | 0,1273 | 0,1184 | 0,2221 |

- Variável: **Comprimento médio da passada (cm)**

| | Sedentários | | Corrida | |
|--------------|-------------|--------|---------|--------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 |
| n | 18 | 18 | 18 | 18 |
| Média | 13,29 | 14,29 | 14,06 | 16,72 |
| EMP | 0,2896 | 0,2645 | 0,2142 | 0,4860 |

2) Efeito da infusão intranasal de MPTP

- Variável: **Largura média da base (cm)**

| | SS | | SMPTP | | CS | | CMPTP | |
|--------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 |
| N | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| Média | 2,519 | 2,914 | 2,675 | 2,835 | 2,928 | 2,792 | 2,851 | 2,723 |
| EMP | 0,1877 | 0,1493 | 0,1763 | 0,09263 | 0,1000 | 0,1045 | 0,1153 | 0,1470 |

- Variável: **Comprimento médio do passo (cm)**

| | SS | | SMPTP | | CS | | CMPTP | |
|--------------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 |
| n | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| Média | 7,559 | 7,762 | 7,723 | 8,018 | 8,857 | 8,838 | 7,929 | 7,937 |
| EMP | 0,3202 | 0,3104 | 0,1542 | 0,09561 | 0,3417 | 0,2004 | 0,3013 | 0,3094 |

- Variável: **Comprimento médio da passada (cm)**

| | SS | | SMPTP | | CS | | CMPTP | |
|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 |
| n | 8 | 8 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| Média | 15,15 | 15,52 | 15,61 | 16,04 | 17,71 | 17,74 | 15,87 | 15,97 |
| EMP | 0,6798 | 0,6544 | 0,3611 | 0,2129 | 0,6958 | 0,4490 | 0,6524 | 0,6702 |

**APÊNDICE C – PARÂMETROS AVALIADOS NO TESTE DE CAMPO ABERTO:
VALORES AMOSTRAIS (N), MÉDIAS E ERROS MÉDIOS PADRÃO (EMP)**

1) Efeito do Exercício em esteira

- Variável: **número de rearing**

| | Sedentários | | Corrida | |
|--------------|-------------|-------|---------|-------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 |
| n | 6 | 6 | 7 | 7 |
| Média | 23,40 | 31,20 | 19,86 | 47,57 |
| EMP | 0,5099 | 7,046 | 1,184 | 4,225 |

- Variável: **duração de rearing (s)**

| | Sedentários | | Corrida | |
|--------------|-------------|-------|---------|-------|
| | T1 | T2 | T1 | T2 |
| n | 6 | 6 | 8 | 8 |
| Média | 27,92 | 58,14 | 31,14 | 97,76 |
| EMP | 3,221 | 16,11 | 5,493 | 11,44 |

2) Efeito da infusão intranasal de MPTP

- Variável: **número de rearing**

| | SS | | SMPTP | | CS | | CMPTP | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 |
| n | 9 | 9 | 11 | 11 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Média | 15,56 | 10,89 | 23,82 | 14,73 | 30,20 | 29,40 | 29,50 | 21,20 |
| EMP | 2,789 | 2,751 | 4,186 | 3,756 | 2,370 | 4,274 | 4,490 | 3,636 |

- Variável: **duração de rearing (s)**

| | SS | | SMPTP | | CS | | CMPTP | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 |
| n | 9 | 9 | 11 | 11 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Média | 29,00 | 25,05 | 35,06 | 34,84 | 70,61 | 71,85 | 77,88 | 56,14 |
| EMP | 5,093 | 5,460 | 6,320 | 9,117 | 7,591 | 10,24 | 13,84 | 10,43 |

- Variável: **número de grooming**

| | SS | | SMPTP | | CS | | CMPTP | |
|----------|----|----|-------|----|----|----|-------|----|
| | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 |
| n | 9 | 9 | 11 | 11 | 10 | 10 | 10 | 10 |

| | | | | | | | | |
|--------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Média | 5,222 | 5,778 | 7,182 | 6,545 | 4,200 | 5,100 | 4,200 | 6,100 |
| EMP | 1,077 | 1,432 | 0,9706 | 0,9280 | 0,9286 | 0,8226 | 0,8667 | 0,9000 |

- Variável: **duração de grooming (s)**

| | SS | | SMPTP | | CS | | CMPTP | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 |
| n | 8 | 8 | 11 | 11 | 10 | 10 | 9 | 9 |
| Média | 35,18 | 44,47 | 28,44 | 38,73 | 24,74 | 31,30 | 26,45 | 41,97 |
| EMP | 8,021 | 9,920 | 4,498 | 6,035 | 3,606 | 5,162 | 9,675 | 7,954 |

- Variável: **distância total percorrida (cm)**

| | SS | | SMPTP | | CS | | CMPTP | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 |
| n | 9 | 9 | 11 | 11 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Média | 2323 | 1783 | 3621 | 2347 | 2452 | 2214 | 3150 | 2319 |
| EMP | 397,2 | 415,1 | 447,8 | 286,9 | 212,8 | 151,6 | 280,1 | 237,2 |

- Variável: **tempo gasto no centro da arena (s)**

| | SS | | SMPTP | | CS | | CMPTP | |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 |
| n | 5 | 5 | 6 | 6 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| Média | 3,787 | 6,800 | 18,19 | 5,289 | 22,43 | 27,00 | 40,72 | 16,34 |
| EMP | 1,546 | 2,351 | 4,356 | 1,278 | 4,671 | 8,294 | 9,205 | 6,601 |

- Variável: **velocidade média (m/min)**

| | SS | | SMPTP | | CS | | CMPTP | |
|--------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 | T3 | T4 |
| n | 9 | 9 | 11 | 11 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Média | 5,823 | 4,461 | 9,065 | 5,868 | 6,138 | 5,533 | 7,875 | 5,798 |
| EMP | 1,038 | 1,118 | 0,7171 | 0,5347 | 0,3790 | 0,7003 | 0,5931 | 1,038 |

APÊNDICE D – NÍVEIS DE FATORES NEUROTRÓFICOS: VALORES AMOSTRAIS (N), MÉDIAS E ERROS MÉDIOS PADRÃO (EMP)

Efeito do exercício e do MPTP

- Variável: Níveis séricos de BDNF (ng/mL)

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 7 | 8 | 7 | 7 |
| Média | 3,109 | 2,365 | 1,971 | 1,853 |
| EMP | 0,1978 | 0,2053 | 0,1203 | 0,2444 |

- Variável: Níveis BDNF no músculo sóleo (pg/mg de proteína total)

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 5 | 5 | 5 | 6 |
| Média | 8,447 | 4,111 | 10,25 | 6,010 |
| EMP | 1,107 | 0,4756 | 2,130 | 0,8154 |

- Variável: Níveis BDNF no músculo tibial (pg/mg de proteína total)

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 6 | 5 | 5 | 5 |
| Média | 2,415 | 4,199 | 4,617 | 2,916 |
| EMP | 0,7397 | 0,6054 | 1,133 | 0,3358 |

- Variável: Níveis séricos de GDNF (pg/mL)

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 7 | 6 | 5 | 6 |
| Média | 21,25 | 16,09 | 14,04 | 15,04 |
| EMP | 7,376 | 4,490 | 2,673 | 4,788 |

- Variável: Níveis séricos de GDNF (pg/mg de proteína)

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 5 | 4 | 4 | 4 |
| Média | 3,836 | 3,253 | 4,709 | 4,578 |
| EMP | 0,3677 | 0,9432 | 0,1365 | 0,3894 |

APÊNDICE E – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO: VALORES AMOSTRAIS (N), MÉDIAS E ERROS MÉDIOS PADRÃO (EMP)

Efeito do exercício e do MPTP

- Variável: % de mitocôndrias no músculo sóleo

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 71 | 75 | 75 | 50 |
| Média | 12,22 | 12,16 | 14,73 | 12,79 |
| EMP | 0,6590 | 0,6236 | 0,7493 | 0,6446 |

- Variável: % de mitocôndrias alteradas no músculo sóleo

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 71 | 75 | 75 | 50 |
| Média | 5,031 | 6,438 | 0,8084 | 4,620 |
| EMP | 0,5077 | 0,5296 | 0,1108 | 0,4356 |

- Variável: % de miofibrilas no músculo sóleo

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 71 | 75 | 75 | 50 |
| Média | 66,03 | 63,72 | 63,14 | 69,21 |
| EMP | 1,476 | 1,045 | 1,397 | 1,089 |

- Variável: % de tríades no músculo sóleo

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 71 | 75 | 75 | 50 |
| Média | 3,696 | 3,483 | 4,669 | 3,598 |
| EMP | 0,2435 | 0,2006 | 0,2477 | 0,2041 |

- Variável: % de sarcoplasma no músculo sóleo

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 71 | 75 | 75 | 50 |
| Média | 12,06 | 18,48 | 13,04 | 12,41 |
| EMP | 0,4128 | 0,6674 | 0,5569 | 0,5381 |

- Variável: % de outras estruturas (núcleo, vasos, gotículas lipídicas, células satélite) no músculo sóleo

| | SS | SMPTP | CS | CMPTP |
|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| n | 71 | 75 | 75 | 50 |
| Média | 5,968 | 2,151 | 4,402 | 1,954 |
| EMP | 1,1820 | 0,6154 | 0,9056 | 0,7438 |