

Patrícia da Conceição Rocha Rabelo

**A CAPACIDADE INTRÍNSECA PARA O EXERCÍCIO  
FÍSICO MODULA A NEUROPLASTICIDADE  
DOPAMINÉRGICA INDUZIDA PELO TREINAMENTO  
FÍSICO AERÓBICO**

Belo Horizonte - MG

Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional

Universidade Federal de Minas Gerais

2017

Patrícia da Conceição Rocha Rabelo

**A CAPACIDADE INTRÍNSECA PARA O EXERCÍCIO  
FÍSICO MODULA A NEUROPLASTICIDADE  
DOPAMINÉRGICA INDUZIDA PELO TREINAMENTO  
FÍSICO AERÓBICO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências do Esporte da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências do Esporte .

**Área de concentração:** Fisiologia do Exercício

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danusa Dias Soares

**Co-orientador:** Prof. Dr. Raphael Escorsim Szawka

**Colaboradores:** Prof. Dr. Cândido Celso Coimbra

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maristela de Oliveira Poletini

Belo Horizonte - MG

Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional

Universidade Federal de Minas Gerais

2017

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFISE) da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional em parceria com o Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo e o Laboratório de Metabolismo Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram concedidos auxílios financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenadoria de Apoio ao Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*Dedico este trabalho aos pilares da minha vida: à minha mãe Dalila Pinto e ao meu  
companheiro Tiago Ramos. Amo muito vocês!*

## AGRADECIMENTOS

À população brasileira por custear meus estudos e permitir a realização de pesquisas em instituições públicas.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro.

A Deus que sempre guiou o meu caminho.

A minha mãe Dalila Pinto da Rocha Rabelo que me aconchega em cada abraço e sorriso. Obrigada por me ensinar a correr atrás dos meus sonhos e por acreditar em mim. A senhora sempre será meu exemplo de mulher guerreira, batalhadora e sonhadora. Te amo mãe!!!

Ao meu companheiro Tiago Gonçalves Ramos. Obrigada por ser meu porto seguro em todos os momentos, por me dar a mão e me ajudar a caminhar nos momentos mais difíceis e por estar ao meu lado comemorando cada vitória. Este trabalho é mérito nosso! Sem você ao meu lado nada disso seria possível. Te amo!!!!

Ao meu pai (*in memoriam*). Obrigada por cada momento ao seu lado. Por me mostrar que a beleza da vida está na simplicidade. Obrigada por me ensinar a valorizar cada instante e por me mostrar que a serenidade e a humildade estão entre as mais belas virtudes do homem.

A toda a minha família por me apoiar sempre.

A minha segunda família (Ramos) pelo acolhimento e carinho.

À professora Dr<sup>a</sup> Danusa Dias Soares por me acolher durante todos esses anos. Obrigada Danusa por entender os meus momentos difíceis e por me apoiar em todas as decisões sempre acreditando no meu potencial. Nesses últimos anos foram muitos acontecimentos inesperados e imprevisíveis que me fizeram escolher determinados caminhos. Ter seu apoio me ajudou a chegar até aqui. Obrigada por sempre entender a Patrícia “filha” com sentimentos e responsabilidades que em muitos momentos fez com que a Patrícia “pesquisadora” ficasse em segundo plano.

Ao professor Dr. Raphael Escorsim Szawka por todo ensinamento científico, pelas conversas esclarecedoras e pelo apoio ao meu trabalho. Obrigada pela paciência e por me instigar sempre a querer mais conhecimento.

Aos professores Dr. Cândido Celso Coimbra e Dr<sup>a</sup> Maristela Polletini por colaborarem com o trabalho e por abrirem às portas dos laboratórios me dando todo suporte para a realização das análises experimentais.

A todos os professores do LAFISE pelo ensinamentos, conselhos e ajuda. Em especial, ao professor Dr. Samuel Penna Wanner. Obrigada pelos conselhos e por estar sempre disponível para me ajudar.

A todos os professores e funcionários da EEEFTO que fizeram parte da minha formação acadêmica.

À Nayara Horta, grande colaboradora do meu projeto. Obrigada por me ajudar, sempre com muito bom humor e disposição no decorrer de todas as análises de PCR. Obrigada pelas conversas, por escutar meus desabafos e entender meu desespero!!!

À Letícia Cordeiro, também colaboradora do meu projeto. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa! Obrigada pelas conversas acadêmicas e “da vida”. Obrigada por sempre se preocupar comigo. Você é uma grande amiga!

Ao Bruno Bernardo, iniciação científica do meu projeto, por me ajudar durante todos experimentos.

Aos meus grandes amigos de laboratório e da vida: Michele Moraes, Cletiana Gonçalves, André Lima e Renata Lanne. Obrigada pela amizade construída no decorrer dos últimos anos!!! Vocês são especiais!!!

A todos os meus colegas do LAFISE. Trabalhar ao lado de vocês nos últimos anos foi uma ótima experiência!!! Obrigada pelas discussões acadêmicas, pelas boas risadas e momentos!!! Vocês sempre fizeram do nosso laboratório um local agradável e acolhedor!

Às minhas amigas Janini Mano, Symara Gonçalves, Andrezza Duarte, Carol Ribeiro, Sintia Barbosa, Cristiane Pereira e Gleice Duarte. Obrigada por entenderem minha ausência inúmeras vez e por me apoiarem sempre!!!

*A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho!!!*

*“A verdadeira coragem é ir atrás de seus sonhos mesmo quando todos dizem que ele é impossível” (CORA CORALINA).*

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar se a capacidade intrínseca para o exercício físico (EF) influencia na neuroplasticidade do sistema dopaminérgico induzida pelo treinamento físico (TF) aeróbico. Inicialmente, ratos *Wistar* foram submetidos a um protocolo de 3 testes de esforço progressivo até a fadiga (TEP). Baseado nos dados prévios do histograma de distribuição de frequência do tempo de exercício (TE) de 210 animais submetidos ao TEP [média TE ( $médiaTE$ ) = 41 min, desvio-padrão (DP) = 16,1 min] (RABELO *et al.*, 2015), os animais da presente pesquisa foram divididos em capacidade baixa (CB), capacidade-média (CM) e capacidade-alta (CA) para a corrida, de acordo com os critérios: CB: animais com um TE <  $médiaTE - 1DP$  (TE < 24,9 min), CA: animais com TE >  $médiaTE + 1DP$  (TE > 57,1 min). Todos os outros animais foram classificados como CM. Na sequência, os ratos foram subdivididos em duas situações experimentais: sedentários (SED) ou treinados (TR). O TF aeróbico foi realizado cinco vezes por semana, durante seis semanas. No início e final do experimento foram efetuadas as medidas do consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) durante um TEP. A partir dos valores obtidos, a eficiência mecânica (EM) foi calculada. Após as 6 semanas, os animais foram eutanasiados e no caudado-putâmen (CPu) foram realizadas as seguintes análises: concentração de dopamina (DA), serotonina (5-HT) e seus metabólitos (DOPAC: 3,4-ácido diidroxifenilacético, 5-HIAA: 5-ácido hidroxindoleacético), RNAm dos receptores de DA D1 e D2 (*Drd1* e *Drd2*), transportador de DA (*Dat*), tirosina hidroxilase (*Th*), fator neurotrófico derivado do cérebro (*Bdnf*) e fator neurotrófico derivado da glia (*Gdnf*). Todos os animais aumentaram o TE com o TF aeróbico, porém a variação percentual do TE foi maior no grupo CB. Antes do TF, o consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ) diferiu entre os grupos (CA > CM > CB). Após as seis semanas, o  $VO_{2max}$  foi maior no grupo CB-TR em relação ao CB-SED e o  $VO_{2max}$  permaneceu maior nos animais CA-TR quando comparados aos CB-TR e CM-TR. A EM, avaliada no momento da fadiga ( $EM_{fadiga}$ ), foi maior em todos os grupos treinados quando comparados aos seus respectivos controles (SED). Nos grupos SED, o *turnover* dopaminérgico foi maior no grupo CA em relação ao CB e CM. Já a expressão do RNAm de *Drd2*

foi maior no grupo CB quando comparado ao CM e CA. O TF aeróbico aumentou o *turnover* dopaminérgico nos animais CB e diminuiu no grupo CA, revertendo a diferença neste sistema monoaminérgico observada entre os grupos SED. Em relação às expressões gênicas, no CPu, o TF aeróbico diminuiu o RNAm de *Drd2* e *Dat* e aumentou o RNAm de *Gdnf* no grupo CB. Por outro lado, o treinamento diminuiu a expressão do RNAm de *Bdnf* no grupo CA. Nossos resultados sugerem que a capacidade intrínseca para o EF influencia a neuroplasticidade do sistema dopaminérgico em resposta ao TF aeróbico.

**Palavras-chave:** Capacidade intrínseca. Treinamento físico aeróbico. Sistema dopaminérgico. Plasticidade neural.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate whether the intrinsic capacity for physical exercise influences the dopaminergic neuroplasticity induced by aerobic physical training. Initially, male Wistar rats were submitted to 3 progressive exercise tests (PET). Based on previous data of frequency distribution histogram [210 animals submitted to PET, average TE ( $\text{average TE}$ ) = 41 min, standard deviation (SD) = 16.1 min] (RABELO *et al.*, 2015), the animals in this study were classified as low-performance (LP), standard-performance (SP) and high-performance (HP) according to the following criteria: LP: animals with TE <  $\text{average TE}$  minus 1 SD (TE < 24.9 min), HP: animals with TE >  $\text{average TE}$  plus 1 SD (TE > 57.1 min). All the other rats were classified as SP. After initial classification, each group was subdivided into two experimental situations: sedentary (SED) and trained (TR). Aerobic physical training lasted six weeks and was performed 5 times/week. Before and after training, oxygen uptake ( $\text{VO}_2$ ) was measured during a progressive exercise protocol and based on results, the mechanical efficiency (ME) was calculated. After six weeks, the animals were euthanized. In the caudate-putamen (CPu) were analyzed dopamine (DA), serotonin (5-HT) and its metabolites (DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 5HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid) and the mRNA expression of dopaminergic receptors D1 and D2 (*Drd1* and *Drd2*), DA transporter (*Dat*), tyrosine hydroxylase (*Th*), glial cell line-derived neurotrophic factor (*Gdnf*) and brain-derived neurotrophic factor (*Bdnf*). The TE in all animals increased with aerobic training. However, the percentage of variation was higher in the LP rats. Before aerobic training, maximal oxygen uptake ( $\text{VO}_{2\text{max}}$ ) was different between groups (HP > SP > LP). After aerobic training, the  $\text{VO}_{2\text{max}}$  remained higher in the HP rats compared to LP and SP groups. The  $\text{VO}_{2\text{max}}$  in the LP-TR was higher compared to LP-SED. The ME was higher in all rats submitted to aerobic training when compared to controls. In SED groups, the dopaminergic turnover was higher in HP groups compared to LP and SP. The mRNA expression of *Drd2* was higher in LP-SED rats compared to SP-SED and HP-SED animals. The aerobic training increased the dopaminergic turnover in LP and decreased in HP rats. These changes reverted the differences observed

in the CPu dopaminergic activity before aerobic training. In the CPu, 6 weeks of aerobic training decreased the mRNA of *Drd2* and *Dat* and increased the mRNA of *Gdnf* in the LP group. In the HP group, the mRNA of *Bdnf* decreased with aerobic training. Taken together, our data suggest that the intrinsic capacity to exercise modulates neuroplasticity of dopaminergic system induced by aerobic physical training.

**Keywords:** Intrinsic capacity. Aerobic physical training. Dopaminergic system. Neuroplasticity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação da síntese, estocagem e degradação dopaminérgica.....	25
FIGURA 2	Representação da sinapse dopaminérgica.....	26
FIGURA 3	Representação da participação dopaminérgica nas vias dos gânglios da base.....	27
FIGURA 4	Representação das vias intracelulares desencadeadas pelo BDNF.....	33
FIGURA 5	Representação das vias intracelulares desencadeadas pelo GDNF.....	34
FIGURA 6	Grupos e situações experimentais.....	40
FIGURA 7	Delineamento experimental.....	41
FIGURA 8	Protocolo da familiarização à corrida na esteira.....	42
FIGURA 9	Protocolo do teste de esforço progressivo.....	43
FIGURA 10	Histograma de distribuição de frequência do tempo máximo de exercício.....	44
FIGURA 11	Figura ilustrativa da região dissecada para as análises cerebrais: CPu.....	50
FIGURA 12	Desempenho nos três TEP entre os grupos CB, CM e CA.....	61
FIGURA 13	TE <sub>max</sub> e Trabalho <sub>max</sub> entre os grupos CB, CM e CA.....	62
FIGURA 14	VO <sub>2</sub> e EM entre os grupos CB, CM e CA.....	64
FIGURA 15	Distância total de treino dos grupos CB, CM e CA.....	65
FIGURA 16	TE <sub>final</sub> e Trabalho <sub>final</sub> entre os grupos CB, CM e CA sedentários e treinados.....	69
FIGURA 17	Variação percentual do TE entre os grupos CB, CM e CA sedentários e treinados.....	70
FIGURA 18	Correlação entre o TE <sub>inicial</sub> e o delta TE entre os grupos CB, CM e CA sedentários e treinados.....	71
FIGURA 19	VO <sub>2</sub> e EM entre os grupos CB, CM e CA sedentários e treinados.....	72

FIGURA 20	Variáveis dopaminérgicas e serotoninérgicas no CPu entre grupos CB, CM e CA sedentários e treinados.....	74
FIGURA 21	RNam das variáveis dopaminérgicas no CPu entre os grupos CB, CM e CA sedentários e treinados.....	76
FIGURA 22	RNam dos fatores neurotróficos no CPu entre os grupos CB, CM e CA sedentários e treinados.....	77

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Critério adotado para a seleção dos animais em relação à capacidade intrínseca para o EF.....	45
TABELA 2 - Protocolos de treinamento físico com ratos propostos na literatura científica.....	45
TABELA 3 - Dados do $TE_{max}$ obtido a 60% do $V_{max}$ .....	46
TABELA 4 - Planilha do treinamento físico aeróbico.....	48
TABELA 5 - Desenhos dos <i>primers</i> .....	55
TABELA 6 - Massa corporal no 1ª TEP dos animais CB, CM e CA	60
TABELA 7 - Tempo de exercício no teste progressivo para a medida do $VO_2$ nos grupos CB, CM e CA.....	63
TABELA 8 - Dados de composição corporal nos animais CB, CM e CA sedentários e treinados.....	67

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

° C - Graus Celsius	DAT - Transportador de dopamina
µL - Microlitro	DDC - Dopa descarboxilase
5-HIAA - 5-ácido hidroxindoleacético	DOPAC - 3-4, ácido diidroxifenilacético
5-HT - Serotonina (5-hidroxitriptamina)	DP - Desvio-padrão
6-OHDA - 6-hidroxidopamina	<i>Drd1 - Gene do receptor dopaminérgico D1</i>
AC - Adenilato ciclase	<i>Drd2 - Gene do receptor dopaminérgico D2</i>
Acc - Núcleo <i>accumbens</i>	EF - Exercício físico
Akt - Proto-oncogene timoma viral	EM - Eficiência mecânica
AMPc - 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico	EPM - Erro padrão da média
ANOVA - Análise de variância	ERK - Quinase regulada por sinal extraclular
ATV - Área tegmentar ventral	FV - Fonte de variação
BDNF - Brain-derived neurotrophic factor (fator neurotrófico derivado do cérebro)	g - Grama
<i>Bdnf - Gene do fator neurotrófico derivado do cérebro</i>	FV - Fonte de variação
BUP - Brupropiona	<i>Gdnf - Gene do fator neurotrófico derivado da glia</i>
CA - Capacidade alta	GDNF - Glia cell line-derived neurotrophic factor (fator neurotrófico derivado da glia)
Ca <sup>++</sup> - Cálcio	HCR - High capacity runner
CAMKII - Complexo cálcio calmodulina	i.c.v. - Intracerebroventricular
CB - Capacidade baixa	IA - Índice de adiposidade
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência	Kg - Quilograma
CM - Capacidade média	LCR - Low capacity runner
COMT - Catecol-O-metil-transferase	m - Metro
CPu - Caudado-putâmen	m/min - Metros por minuto
CREB - Elemento de resposta ligado ao AMPc	mA - Miliampér
CT - Ciclos de temperatura	MAO - Monoamina oxidases
D1 - Receptor de dopamina D1	MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
D2 - Receptor de dopamina D2	MC - Massa corporal
DA - Dopamina (3,4 dihidroxifeniletilamina)	médiaTE - Média do tempo de exercício
DARPP-32 - Fosfoproteína regulada por AMPc e DA	MEK - Proteína quinase ativada por mitógeno
<i>Dat - Gene do transportador de dopamina</i>	mg/dL - Miligramas por decilitro
	min - Minuto
	mL - Mililitro

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
mV - Milivolts  
ng/mL - Nanograma por mililitro  
qPCR-RT - Transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real  
PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase  
PKA - Proteína quinase A  
PLC - Fosfolipase C  
r - Coeficiente de correlação  
r<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação  
RNAm - RNA mensageiro  
rpm - Rotações por minuto  
SED - Sedentário  
SHR - Ratos espontaneamente hipertensos  
SNC - Sistema nervoso central  
SNpc - Substância negra pars compacta

SNpr - Substância negra pars reticulada  
TAE - Tecido adiposo epididimal  
TAM - Tecido adiposo mesentérico  
TAR - Tecido adiposo retroperitoneal  
TDAH - Transtorno do déficit de atenção com hiperatividade  
TE - Tempo de exercício  
TE<sub>max</sub> - Tempo de exercício máximo  
TEP - Teste de esforço progressivo  
TF - Treinamento físico  
Th - Gene da tirosina hidroxilase  
TH - Tirosina hidroxilase  
TH - Tirosina hidroxilase  
TR - Treinado  
V - Velocidade  
VMAT - Transportador vesicular de DA  
V<sub>max</sub> - Velocidade máxima  
VO<sub>2max</sub> - Consumo máximo de oxigênio

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Introdução.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Sistema dopaminérgico.....</b>	<b>23</b>
1.2.1 Sistema dopaminérgico e exercício físico agudo.....	28
1.2.2 Sistema dopaminérgico e exercício físico crônico.....	29
<b>1.3 Neuroplasticidade, fatores neurotróficos e exercício físico.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4 Sistema dopaminérgico e diferenças intrínsecas para o desempenho físico.....</b>	<b>35</b>
<b>1.5 Objetivo geral do estudo.....</b>	<b>37</b>
<b>1.6 Hipóteses adotadas para o estudo.....</b>	<b>38</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>2.1 Cuidados éticos.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2 Amostra.....</b>	<b>39</b>
<b>2.3 Delineamento experimental.....</b>	<b>39</b>
<b>2.4 Protocolo de familiarização a corrida em esteira rolante.....</b>	<b>42</b>
<b>2.5 Protocolo do teste de esforço progressivo.....</b>	<b>43</b>
<b>2.6 Seleção dos animais em relação à capacidade intrínseca para o exercício físico.....</b>	<b>44</b>
<b>2.7 Protocolo de treinamento físico aeróbico.....</b>	<b>45</b>
<b>2.8 Protocolo para a medida do consumo de oxigênio.....</b>	<b>49</b>
<b>2.9 Eutanásia.....</b>	<b>49</b>
<b>2.10 Análise das monoaminas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa.....</b>	<b>51</b>
<b>2.11 Análise do RNAm pela técnica de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo</b>	<b>52</b>
<b>2.12 Variáveis.....</b>	<b>56</b>
<b>2.13 Análise estatística.....</b>	<b>58</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
<b>3.1 Seleção e caracterização dos animais com diferenças na capacidade intrínseca para o exercício físico.....</b>	<b>60</b>

<b>3.2 Efeito do treinamento físico aeróbico nos animais com diferenças na capacidade intrínseca para o exercício físico.....</b>	<b>65</b>
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1 Conclusão.....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>108</b>

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Introdução

Durante a realização de um exercício físico (EF) ocorrem alterações em vários sistemas fisiológicos, como: cardiovascular, endócrino, termorregulatório, respiratório e nervoso. Observa-se, por exemplo, aumento da pressão arterial média e frequência cardíaca (WANNER *et al.*, 2010; MCARDLE *et al.* 2003), aumento da atividade neural (FOLEY *et al.*, 2012; SOYA *et al.*, 2011), vasodilatação periférica (CORDEIRO *et al.*, 2014; WANNER *et al.*, 2007; MCARDLE *et al.* 2003), aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (DROSTE *et al.*, 2009) e do consumo de oxigênio (GONZALEZ *et al.*, 2006; MCARDLE *et al.* 2003), dentre outras. Todas essas mudanças, ao serem constantemente integradas no sistema nervoso central (SNC), resultam em ajustes eferentes com o intuito de possibilitar a continuação do esforço (ST CLAIR GIBSON e NOAKES, 2004; RODRIGUES e SILAMI-GARCIA, 1998).

Dentre as alterações desencadeadas agudamente pelo EF, no SNC destacam-se as observadas nas transmissões de 5-hidroxitriptamina (serotonina, 5-HT) e 3,4 dihidroxifeniletilamina (dopamina, DA). No decorrer da execução de um EF aeróbico com aumentos progressivos da intensidade de esforço até a fadiga, nota-se, em diferentes áreas neurais, aumentos gradativos na atividade serotoninérgica e dopaminérgica. Entretanto, com a aproximação do momento da interrupção do esforço, observa-se que apenas a atividade serotoninérgica se mantém elevada, enquanto a atividade dopaminérgica retorna para o basal ou,

até mesmo, reduz (RABELO *et al.*, 2015; BALTHAZAR *et al.*, 2009; BAILEY *et al.*, 1993). A mudança na cinética destas monoaminas, promove um aumento na relação entre a atividade desses neurotransmissores (relação “5-HT/DA”), o que vem sendo considerado como um dos componentes que contribuem para a fadiga [modelo denominado como “*Hipótese da Fadiga Central*” (DAVIS e BAILEY, 1997; BAILEY *et al.*, 1993)].

A relação entre desempenho físico monoaminas foi estabelecida inicialmente na década de 70 quando Romanowski e Grabiec (1974) encontraram que o aumento na concentração de 5-HT em decorrência do exercício, repercutia em diminuição dos processos de oxirredução e hiperpolarização neuronal. Demonstrou-se, *a posteriore*, que o aumento da 5-HT, durante o exercício físico, era decorrente da maior disponibilidade de triptofano (TRP) central (CHAOULOFF *et al.*, 1985), sendo tal modulação específica de algumas áreas cerebrais (CHAOULOFF *et al.*, 1989) e influenciada pelo treinamento (ACWORTH *et al.*, 1986). Com base nesses resultados em 1987 foi proposto a “*Hipótese da Fadiga Central*” (NEWSHOLME *et al.*, 1992). Já os estudos sobre DA e o exercício físico tiveram início na década de 70, quando foi observado que o agonista dopaminérgico – metanfetamina – desencadeava aumento no tempo de exercício (TE) (GERALD, 1978). Essa ideia foi reforçada por experimentos que realizaram lesões na via estriatal e observaram redução no desempenho (HEYES *et al.*, 1985). Além disso, constatou-se que o exercício gerava aumentos gradativos na concentração de DA e seus metabólitos em áreas cerebrais (HEYES *et al.*, 1988; CHAOULOFF *et al.*, 1987; FREED e YAMAMOTO, 1985). Prosseguindo nessa linha de pesquisa, indícios da

inibição de DA sob 5-HT, durante o exercício, foram demonstrados a partir dos resultados de aumento e diminuição da atividade serotoninérgica com o uso de antagonista e agonista dopaminérgico, respectivamente (CHAOULOFF *et al.*, 1987). Em 1993, Bailey e colaboradores evidenciaram a relação inibitória recíproca entre as monoaminas (BAILEY *et al.*, 1993). Assim, adveio a reformulação da “Hipótese da Fadiga Central”, fundamentada na relação 5-HT/DA (DAVIS e BAILEY, 1997).

Além das respostas agudas, o EF quando realizado cronicamente desencadeia mudanças estruturais em diferentes áreas do SNC (CASSILHAS *et al.*, 2016; SILVA e ARIDA, 2015; GARCIA *et al.*, 2012; THOMAS *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2010; VAYNMAN e GOMEZ-PINILLA, 2005). Tais respostas induzidas pelo EF já foram constatadas com a utilização de diferentes protocolos, por exemplo: EF forçado (na esteira) (LEASURE e JONES, 2008; HUANG *et al.*, 2006), voluntário (roda) (BERCHTOLD *et al.*, 2005; GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2002) e exercícios de equilíbrio (GARCIA *et al.*, 2012; KLINTSOVA *et al.*, 2004).

As adaptações estruturais decorrentes do EF crônico também têm sido observadas nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico (TAJIRI *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2010; FOLEY e FLESHNER, 2008; DWYER e BROWNING, 2000). Tais modificações ocorrem devido a liberação de fatores neurotróficos que, por meio de cascatas sinalizadoras, alteram a expressão gênica neuronal (LU *et al.*, 2003; MITCHELL *et al.*, 2010; VAN PRAAG; 2008).

Complementando as investigações acerca das respostas agudas e crônicas ao EF, nas últimas décadas, inúmeros trabalhos têm demonstrado que o desempenho físico é influenciado por fatores genéticos (capacidade intrínseca) e ambientais (por exemplo: treinamento físico). Em relação aos fatores genéticos, pesquisas realizadas com mamíferos (como ratos e camundongos) constataram uma variabilidade intrínseca na capacidade de exercitar (KOCH e BRITTON, 2008; MASSETT e BERK, 2005; KOCH e BRITTON, 2001) que se manifesta inter (HOYDAL *et al.*, 2007; MASSETT e BERK, 2005) e intra (RABELO *et al.*, 2015; PRÍMOLA-GOMES *et al.*, 2009) linhagens. Especificamente, em pesquisa desenvolvida no nosso laboratório, observamos que ratos da linhagem *Wistar*, que possuem alta capacidade intrínseca para realizar o EF, apresentam maior atividade dopaminérgica basal no caudado-putâmen [CPu, área cerebral relacionado com o controle motor e motivação para o EF (KNAB e LIGHTFOOT, 2010)], que pode ser um dos fatores que contribui para o alto desempenho nesse grupo (RABELO *et al.*, 2015). Complementando nossos achados anteriores e reforçando nossa argumentação, outros autores têm ressaltado que a atividade do sistema dopaminérgico aumenta a motivação para corrida em linhagens de animais provenientes de cruzamento genético [seleção artificial divergente] que apresentam alto desempenho (FOLEY e FLESHNER, 2008; KNAB e LIGHTFOOT, 2010).

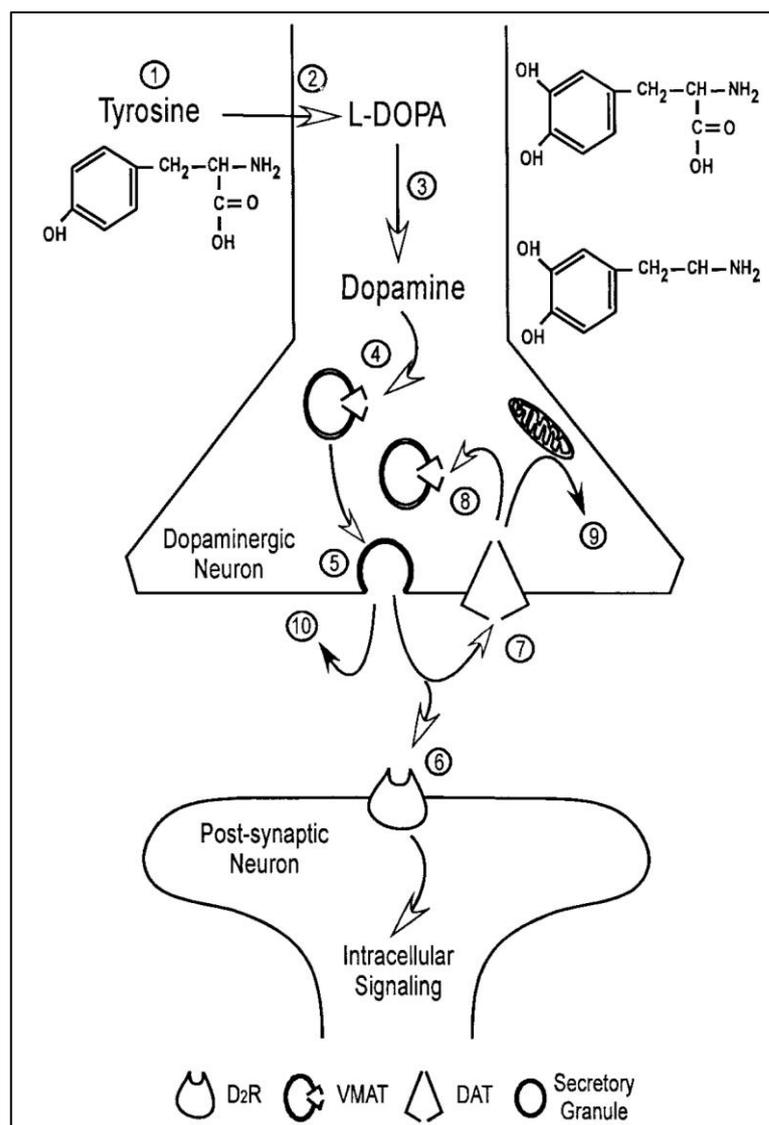
Além da variação na capacidade intrínseca, a treinabilidade de mamíferos ao serem submetidos a um protocolo crônico de EF, também tem sido evidenciada, o que pode ser resultado da interação entre genética e ambiente

(STEPHENSON *et al.*, 2013; GROVES-CHAPMAN, 2011; MASSET e BERK, 2005; KOCH *et al.*, 2005; TROXELL *et al.*, 2003). No entanto, os estudos que buscam relacionar essas duas variáveis, capacidade intrínseca e treinabilidade, ainda são escassos na literatura. Assim o objetivo do presente estudo foi investigar se diferenças na capacidade intrínseca para o EF aeróbico influenciam na treinabilidade. Considerando que a capacidade intrínseca para o EF está relacionada a alterações no sistema dopaminérgico, também tivemos como objetivo verificar se animais com diferenças intrínsecas na capacidade de corrida apresentam diferenças na plasticidade dopaminérgica em resposta ao treinamento físico (TF) aeróbico.

## **1.2 Sistema dopaminérgico**

As principais vias do sistema dopaminérgico são: via mesocorticolímbica (projeções da área tegmentar ventral para hipocampo, núcleo accumbens, amígdala, bulbo olfatório, córtex pré-frontal, córtex orbital e giro cingulado), tuberoinfundibular (projeções do núcleo arqueado para hipófise anterior) e nigroestriatal [projeções da substância negra pars compacta (SN<sub>pc</sub>) para o CPu] (RANGEL-BARAJAS e FLORÁN, 2015; BEN-JONATHAN e HNASKO, 2001). Através dessas vias, a DA está envolvida na regulação endócrina (liberação de prolactina), mecanismos de recompensa, motivação e regulação do controle motor (HOWE *et al.* 2013; KRAVITZ e KREITZER, 2012; BEN-JONATHAN e HNASKO, 2001). Especificamente, a via nigroestriatal participa do controle do movimento e da motivação para o EF (KNAB e LIGHTFOOT, 2010).

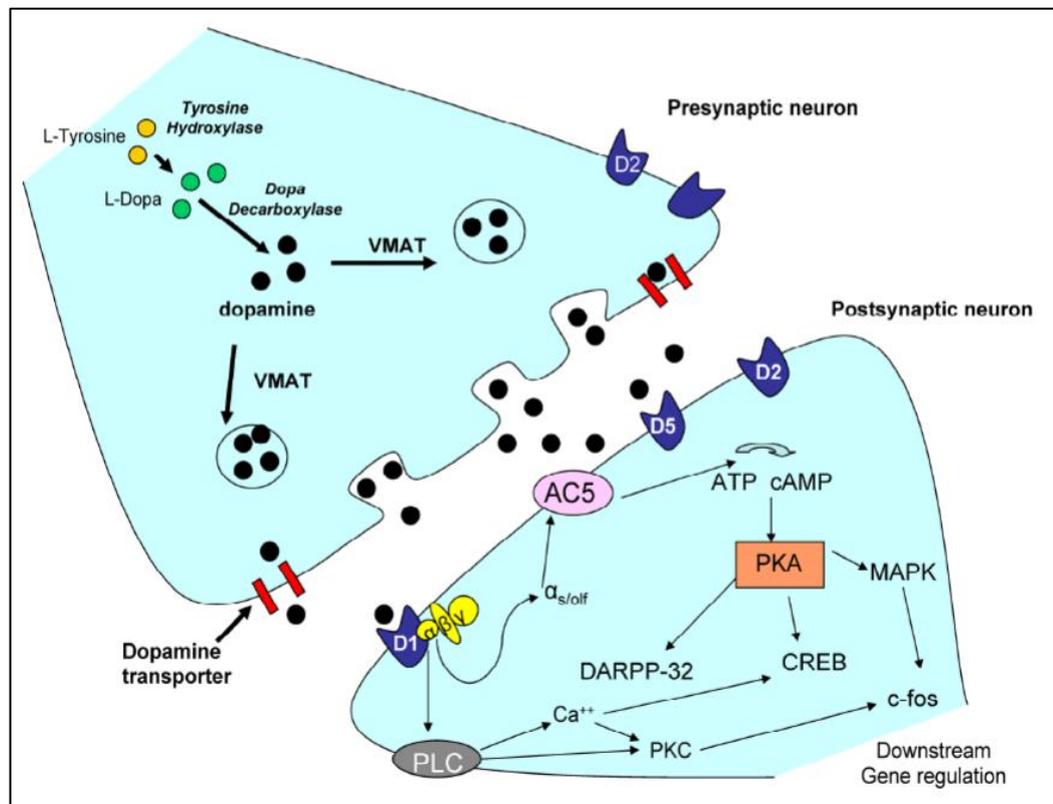
A DA é sintetizada a partir do aminoácido tirosina pelas enzimas tirosina hidroxilase (TH, enzima limitante da síntese dopaminérgica) e DOPA descarboxilase. A atividade da enzima TH é regulada pelo sistema cálcio-calmodulina, portanto, um aumento de cálcio no SNC pode resultar em maior ativação do sistema dopaminérgico – resposta que ocorre durante o EF (AKIYAMA e SUTOO, 1999). Ao ser liberada na fenda sináptica, a DA, ao se ligar a um dos seus receptores, desencadeia cascatas de sinalizações celulares. Os receptores dopaminérgicos são membros de uma superfamília de receptores acoplados a proteína G e estão agrupados em duas subfamílias: dos receptores D1 (D1 e D5) e dos receptores D2 (D2, D3 e D4) (BEN-JONATHAN e HNASKO, 2001). Os receptores da subfamília D1 estão localizados nos neurônios pós-sinápticos acoplados a proteína G excitatória, o que resulta em aumento da atividade da adenilato ciclase (AC) e aumento da produção de 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPc). Por outro lado, os receptores da subfamília D2 estão presentes nos neurônios pré e pós-sinápticos acoplados a proteína G inibitória, o que desencadeia diminuição do AMPc (BEN-JONATHAN e HNASKO, 2001; SEALFON e OLANOW, 2000). Após ser liberada na fenda sináptica, a DA pode se ligar aos seus receptores pré ou pós-sinápticos ou ser recaptada para o neurônio pré-sináptico através do transportador de DA (DAT), onde será degradada pelas ação das enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol-O-metil-transferase (COMT) ou ficará armazenada em vesículas (BEN-JONATHAN e HNASKO, 2001; SEALFON e OLANOW, 2000) (FIG. 1).



**FIGURA 1 - Representação da síntese, estocagem, liberação e degradação dopaminérgica** (1) Tirosina é captada para dentro do neurônio dopaminérgico pré-sináptico. (2) Tirosina é convertida para L-DOPA pela TH, passo limitante da via de biossíntese ativado pelo sistema cálcio-calmodulina. (3) L-DOPA é convertida em DA pela enzima DDC. (4) DA é translocada dentro de vesículas secretórias para ser armazenada e, posteriormente, secretada. (5) Fusão de vesículas secretórias com a membrana plasmática resulta na liberação da DA na fenda sináptica. (6) DA liga aos receptores de membrana e inicia múltiplas respostas na célula alvo. (7) DA não-ligada é captada pelo DAT. (8) Ambas, a DA recém sintetizada e a DA captada pelo neurônio pré-sináptico, são translocadas para dentro de vesícula secretórias pela VMAT. (9) MAO, localizada na membrana externa da mitocôndria, converte DA para o seu metabólito. (10) COMT converte DA ou o metabólito para produtos inativos. Abreviações: COMT: Catecol-O-metil-transferase; DA: dopamina; DAT: transportador de DA; DDC: dihidroxifenilalanina descarboxilase; MAO: monoamina oxidase; TH: tirosina hidroxilase; VMAT: transportador vesicular de DA (Legenda adaptada, figura retirada BEN-JONATHAN e HNASKO, 2001).

Nos neurônios pós-sinápticos, a DA desencadeia cascatas celulares que modulam os complexos quinase regulada por sinal extracelular (ERK)/proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), elemento de resposta ligado ao AMPc

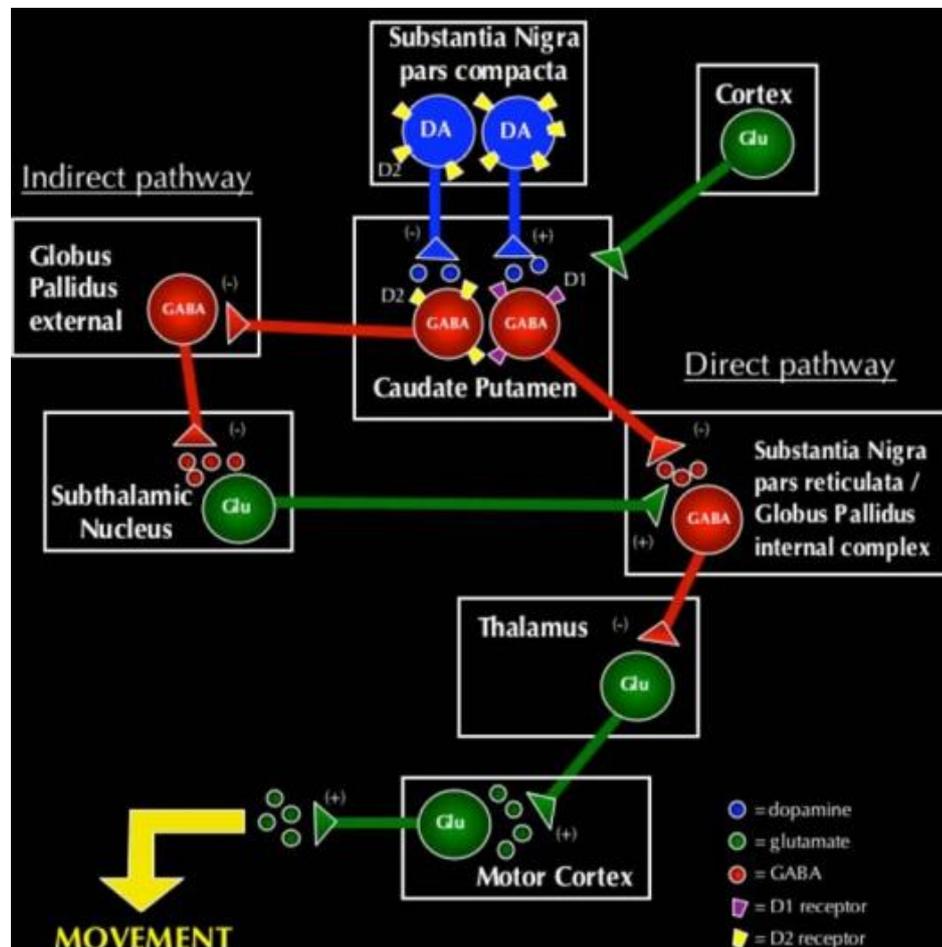
(CREB), complexo cálcio-calmodulina (CAMKII) e fosfoproteína regulada por AMPc e DA (DARPP-32), dentre outras (RANGEL-BARAJAS e FLORÁN, 2015; KNAB e LIGHTFOOT, 2010) (KNAB e LIGHTFOOT, 2010) (FIG. 2).



**FIGURA 2 - Representação da sinapse dopaminérgica.** As vias de sinalização no neurônio pós-sináptico são somente representativas da sinalização dos receptores D1 (com aumento de AMPc). Os receptores D2 desencadeiam diminuição do AMPc. Abreviações - AC5: adenilato ciclase 5; ATP: adenosina trifosfato; CREB: elemento de resposta ligado ao APMc; DARPP-32: fosfoproteína regulada por AMPc e DA; D1: receptor dopaminérgico 1; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; PKA: proteína quinase A; PKC: proteína quinase C; PLC: fosfolipase C; VMAT: transportador vesicular de monoamina; c-fos: gene de ativação imediata (Legenda adaptada, figura retirada de KNAB e LIGHTFOOT, 2010).

Especificamente na via nigroestriatal, a DA participa na regulação da via direta e indireta do controle motor (KRAVITZ e KREITZER, 2012). No CPu, ambos os receptores, D1 e D2, são altamente expressos, porém, o receptor D1 potencializa a atividade da via direta, enquanto o receptor D2 inibe a via indireta. Em ambas, a resposta final desencadeada pela DA consiste em aumento da atividade do córtex motor (SEALFON e OLANOW, 2000) (FIG. 3).

Além da regulação do controle motor, estudos recentes têm demonstrado que a DA na via nigroestriatal também está envolvida na motivação para o EF (KRAVITZ e KREITZER, 2012; KNAB *et al.*, 2010).



**FIGURA 3 - Representação da participação dopaminérgica nas vias dos gânglios da base.** Ativação de neurônios da SN<sub>pc</sub> desencadeia a liberação de DA no CPu. Quando a DA se liga aos receptores D1, expressos em neurônios GABAérgicos no CPu, ocorre aumento da transmissão GABAérgica para SN<sub>pr</sub> / globo pálido interno. Isso resulta em diminuição da atividade GABAérgica da SN<sub>pr</sub> / globo pálido interno para o tálamo. Como consequência, ocorre aumento da transmissão glutamatérgica do tálamo para o córtex motor para iniciar e regular o movimento. Quando a DA se liga aos receptores D2, expressos em neurônios GABAérgicos no CPu, ocorre diminuição da transmissão GABAérgica para o globo pálido externo. Com isso, o globo pálido externo aumenta a transmissão GABAérgica para o subtálamo. Consequentemente, ocorre diminuição da transmissão glutamatérgica do subtálamo para a SN<sub>pr</sub> / globo pálido interno. Isso desencadeia diminuição da transmissão GABAérgica para o tálamo. Na sequência, o tálamo aumenta a atividade glutamatérgica para o córtex motor para iniciar e regular o movimento. Abreviações – CPu: caudado-putâmen; DA: dopamina; SN<sub>pc</sub>: substância negra *pars compacta*; SN<sub>pr</sub>: substância negra *pars reticulada* (Legenda adaptada, figura retirada de FOLEY e FLESHNER, 2010).

A importância do sistema dopaminérgico no controle do movimento fica evidente em situações patológicas, como na doença de Parkinson, que é resultante de uma degeneração na via nigroestriatal. Os sintomas clássicos dessa doença são tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (BLESA *et al.*, 2012).

Considerando os dados do nosso laboratório que demonstram maior atividade dopaminérgica basal no CPu de animais com alta capacidade para o EF aeróbico (RABELO *et al.*, 2015) e a associação dessa área com respostas importantes para o desempenho físico, a via nigroestriatal foi o foco do presente estudo.

### *1.2.1 Sistema dopaminérgico e exercício físico agudo*

No decorrer de um exercício progressivo até a fadiga, observa-se aumento na atividade dopaminérgica, porém, à medida que o EF progride, essa atividade tende a retornar para os valores basais, contribuindo assim, para a interrupção do esforço (BAILEY *et al.*, 1993). De fato, estudos têm demonstrado que o aumento farmacológico de DA no SNC, previamente à realização do EF, resulta em respostas fisiológicas que aumentam o desempenho físico (BALTHAZAR *et al.*, 2009; WATSON *et al.*, 2005; BAILEY *et al.*, 2003). Balthazar e colaboradores (2009) observaram que a administração intracerebroventricular (*i.c.v.*) de DA desencadeia uma atenuação na queda na eficiência mecânica no decorrer de um exercício físico aeróbico realizado em esteira, além de alterar o mecanismo protetor que faz com que o animal interrompa o esforço ao atingir

valores elevados de temperatura interna. Somando-se a essas evidências, o uso de antagonistas dopaminérgicos, também *i.c.v.*, desencadeia diminuição no TE e no consumo máximo de oxigênio ( $VO_{2max}$ ) em exercício aeróbico de intensidade progressiva, além de hipertermia que persiste na recuperação após o esforço (BALTHAZAR *et al.*, 2010). A participação do sistema dopaminérgico no desempenho físico também tem sido foco de pesquisas em seres humanos. No trabalho de Watson e colaboradores (2005), os indivíduos ao realizarem um exercício no ambiente quente (30°C), após ingerirem bupropiona (BUP) (inibidor da recapitação de DA e noradrenalina), apresentaram uma melhora no desempenho quando comparados ao grupo controle. Nessa situação, o grupo BUP finalizou o EF com maiores valores de temperatura interna, mas sem alterações na percepção subjetiva de esforço.

Nota-se, portanto, que a atividade do sistema dopaminérgico influencia a capacidade de realizar o EF através da modulação de respostas fisiológicas importantes para o desempenho físico.

### 1.2.2 Sistema dopaminérgico e o exercício físico crônico

Somando aos dados que demonstram o efeito da atividade dopaminérgica no EF agudo, estudos têm demonstrado que o EF crônico desencadeia alterações estruturais em neurônios dopaminérgicos, tais como: aumento da expressão de RNAm de receptores dopaminérgicos D2 (*Drd2*) pós-sinápticos, aumento da expressão de RNAm da enzima *Th*, diminuição da expressão do RNAm do autorreceptor inibitório dopaminérgico (FOLEY e FLESHNER, 2008),

diminuição da liberação e captação dopaminérgica induzida por anfetamina (MARQUES *et al.*, 2008), aumento de proteínas estruturais no corpo estriado (GARCIA *et al.*, 2012) e diminuição da atividade dopaminérgica basal (MEEUSEN *et al.*, 1997) – fatores que podem influenciar o desempenho físico.

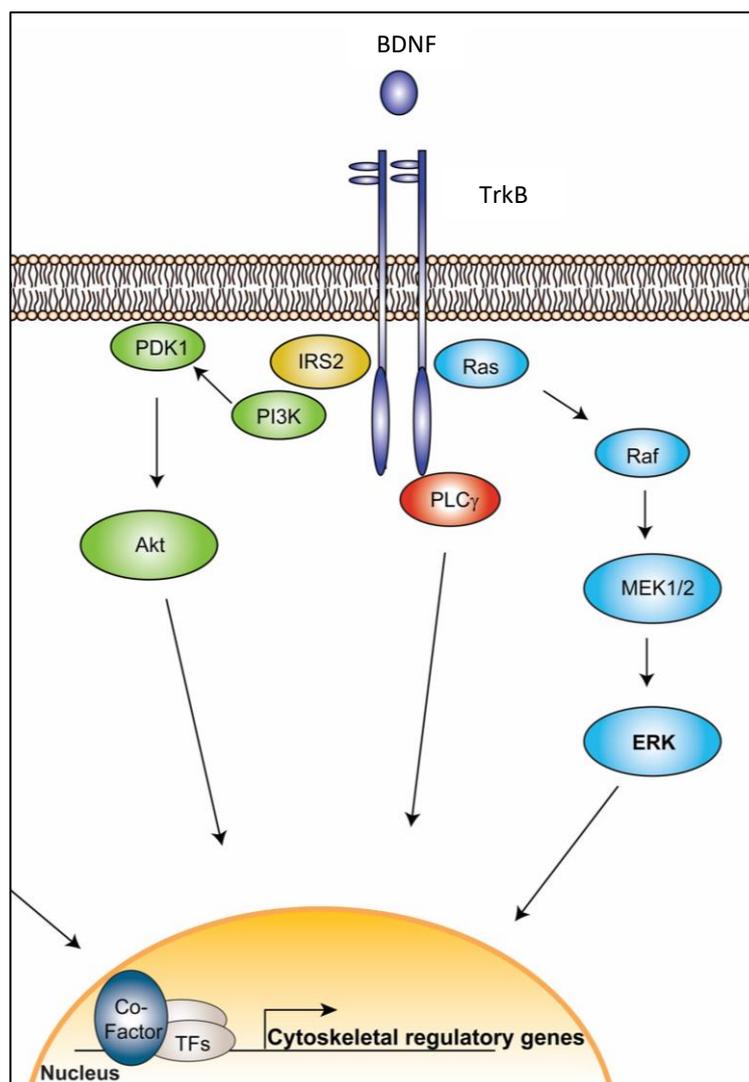
As adaptações induzidas pelo EF, no sistema dopaminérgico, também vêm sendo investigadas em animais submetidos a lesões na via nigroestriatal [com fármacos 6-hidroxidopamina (6-OHDA) - para ratos) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) - para camundongos)] – e os resultados obtidos com estes métodos complementam aqueles encontrados nos modelos com tecido neuronal intacto. Esses modelos de lesões dopaminérgicas levam a quadros semelhantes aos observados na doença de Parkinson (BLANDINI e ARMENTERO, 2012; DUTY e JENNER, 2011). O EF realizado pós-lesão induz a liberação de fatores neurotróficos que ativam vias de sinalizações e minimizam o estresse oxidativo, atenuando a degradação dopaminérgica (TUON *et al.*, 2012; STAHL *et al.*, 2011; TAJIRI *et al.*, 2010; ZIGMOND *et al.*, 2009). Além disso, tem sido mostrado aumento do número de neurônios (TAJIRI *et al.*, 2010) e receptores de DA (FISHER *et al.*, 2004) e diminuição no número de transportadores (PETZINGER *et al.*, 2007), o que resulta em melhora no controle motor (SMITH *et al.*, 2011; GORTON *et al.*, 2010; PETZINGER *et al.*, 2007).

### **1.3 Neuroplasticidade, fatores neurotróficos e exercício físico**

As adaptações estruturais e de funcionamento do SNC são denominadas na literatura científica como neuroplasticidade. Este termo pode ser definido como a capacidade do encéfalo de modificar sua estrutura e/ou função em resposta a diferentes estímulos (FUCHS e FLUGGE, 2014; COWANSAGE *et al.*, 2010; MITCHELL, 2010; LU *et al.*, 2003; LLEDO *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado que esse processo ocorre, dentre outros, em resposta ao EF crônico através da liberação de fatores neurotróficos, tais como: fator neurotrófico derivado do cérebro (*brain-derived neurotrophic factor*, BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (*glial cell line-derived neurotrophic factor*, GDNF), fator de crescimento do nervo (*nerve growth factor*, NFG) e fator de crescimento semelhante à insulina (*insuline-like growth factor 1*, IGF-1) (TUON *et al.*, 2012; ZIGMOND *et al.*, 2009; FISHER *et al.*, 2004). Todos esses fatores induzem à adaptações no SNC, como: modificações no número e sensibilidade de receptores, na arborização dendrítica, no número de sinapses, na vascularização neural e também aumento da potencialização de longo prazo (GARCIA *et al.*, 2012; THOMAS *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2010; MARAIS *et al.*, 2009, VAN PRAAG, 2008; VAYNMAN e GOMEZ-PINILLA, 2005; GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2002).

O BDNF tem sido descrito na literatura como o principal fator trófico que medeia os efeitos do EF no SNC (SEIFERT *et al.*, 2010; MITCHELL, 2010; O'CALLAGHAN *et al.*, 2009; CECHETTI *et al.*, 2008; BERCHTOLD *et al.*, 2005). Membro da família das neurotrofinas, o BDNF desencadeia a

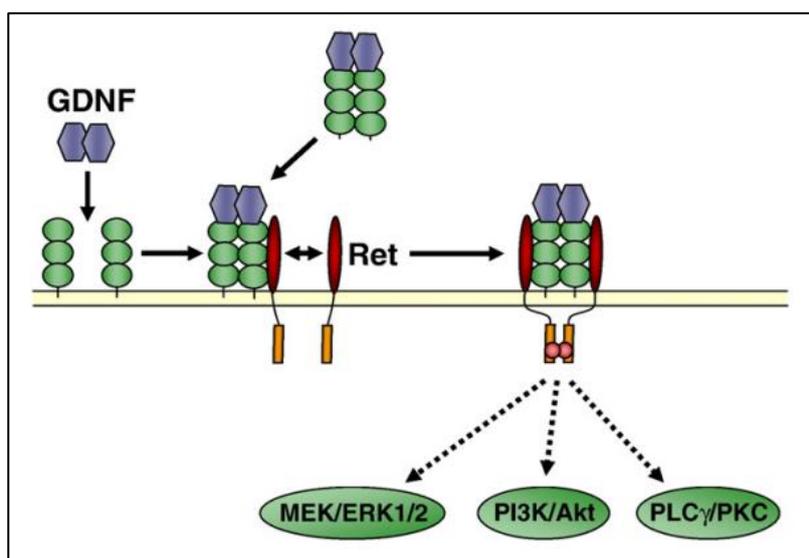
dimerização e autofosforilação em resíduos de tirosina do seu receptor específico, denominado TrkB, potencializando diferentes cascatas de sinalização intracelular, como: via da proteína quinase ativada por fator extracelular (ERK), via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a via da fosfolipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ). As cascatas de sinalizações geradas pelo BDNF ativam fatores que alteram a transcrição gênica (FIG. 4) (LU, 2003; RUSSO *et al.*, 2009). Estudos têm demonstrado que o EF induz a aumentos na expressão do RNAm de *Bdnf* e na síntese da proteína BDNF no SNC (BERCHTOLD *et al.*, 2005; GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2002; OLIFF *et al.*, 1998; NEEPER *et al.*, 1996). Já foi mostrado que esse aumento ocorre com três sessões de EF aeróbico moderado – 60% do consumo máximo de oxigênio (HUANG *et al.*, 2006) ou dois dias de acesso a roda e pode perdurar por até dez dias após a interrupção do esforço (BERCHTOLD *et al.*, 2005; OLIFF *et al.*, 1998).



**FIGURA 4 - Representação das vias intracelulares desencadeadas pelo BDNF.** Através da ligação com o seu receptor específico, o BDNF ativa 3 principais vias de sinalização: via da PI3K-Akt, via da GTPase(Ras)-MEK e ERK e a via da PLC-γ. Abreviações - Akt: proto-oncogene timoma viral; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; IRS: substrato do receptor de insulina; MEK: proteína quinase ativada por mitógeno; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; PLC-γ : fosfolipase C-γ; Ras: GTP-ase (figura e legenda adaptadas de Russo *et al.*, 2009).

O GDNF tem sido descrito como o principal fator trófico associado com a plasticidade do sistema dopaminérgico (CARNICELLA e RON, 2009). O GDNF é membro da superfamília do fator de crescimento  $\beta$ , sendo encontrado predominantemente no corpo estriado. Ao ser liberado, ele se liga ao seu receptor específico GFR $\alpha$ 1, acoplado ao receptor de sinalização transmembrana da tirosina quinase (Ret), o que induz a cascatas de

sinalizações semelhantes às induzidas pelo BDNF, como: ERK/MAPK, PI3K e PLC- $\gamma$  (FIG. 5). Através dessas sinalizações, o GDNF promove a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos (CARNICELLA e RON, 2009), inclusive em quadros da doença de Parkinson (SUN *et al.*, 2005; GILL *et al.*, 2003). Estudos têm demonstrado aumento de GDNF após a realização de EF de intensidade moderada e alta no tecido neuronal intacto ou após lesões nigroestriatais (ALZALPOUR *et al.*, 2015; LAU *et al.*, 2011; TAJIRI *et al.*, 2010).



**FIGURA 5 – Representação das vias intracelulares desencadeadas pelo GDNF mediadas pelo GFR $\alpha$ 1 e Ret.** Ligação do GDNF com GFR $\alpha$ 1 aumenta a afinidade do GFR $\alpha$ 1 com Ret, induzindo a dimerização do receptor. Ret é ativado pela autofosforilação dos resíduos de tirosina, levando para ativação de vias de sinalização, como ERK/MAPK, PI3K e PLC- $\gamma$ . Abreviações: Akt: proto-oncogene timoma viral; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; GDNF: fator neurotrófico derivado da glia; MEK: proteína quinase ativada por mitógeno; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; PLC- $\gamma$  : fosfolipase C- $\gamma$ ; Ret: receptor de sinalização transmembrana da tirosina quinase (figura retirada de CARNICELLA e RON, 2009).

Em relação a neuroplasticidade induzida pelo EF, os dados da literatura mostram que o exercícios físicos aeróbicos de baixa e moderada intensidades são mais eficazes em promover aumentos na liberação de fatores neurotróficos que irão desencadear respostas de plasticidade neural. Os exercícios de alta intensidade, em função de promoverem aumento exacerbado da corticosterona (observado em ratos e camundongos), inibem a liberação desses fatores

tróficos (SOYA *et al.*, 2011; KASHIHARA *et al.*, 2009; COTMAN *et al.*, 2007; SOYA *et al.*, 2007).

#### **1.4 Sistema dopaminérgico e diferenças intrínsecas para o desempenho físico**

Considerando a relação recíproca entre desempenho físico e atividade dopaminérgica, nos últimos anos, alguns pesquisadores tem investigado se a diferença intrínseca na capacidade de realizar o EF pode estar associada a alterações determinadas geneticamente nesse sistema neural (FOLEY *et al.*, 2012; MATHES *et al.*, 2010; FOLEY *et al.*, 2008). Com esta finalidade, animais manipulados geneticamente para divergirem em relação ao desempenho físico vêm sendo utilizados. Para a realização da manipulação genética, em 1997, um grupo de pesquisadores submeteram 168 animais, que apresentavam uma alta variabilidade genética, a cinco testes progressivos de corrida na esteira. Na sequência, 13 machos e 13 fêmeas de cada extremo, em relação ao desempenho físico na corrida (corredores “bons” “e ruins”), foram selecionados e cruzados entre eles. Assim, foram desenvolvidas as castas de animais com alta (HCR – *high capacity runner*) e baixa (LCR – *low capacity runner*) capacidade para a corrida (KOCH e BRITTON, 2001). Desde então, diversos experimentos estão sendo realizados para investigar quais alterações estes animais apresentam nos sistemas fisiológicos que levam às diferenças observadas na capacidade de se exercitar. Alguns resultados encontrados entre as castas, foram: periféricos [atividade de enzimas glicolíticas e densidade capilar no músculo, consumo máximo de oxigênio, densidade

capilar, composição corporal, dentre outras (SWALLOW *et al.*, 2010; HENDERSON *et al.*, 2002; HOWLETT *et al.*, 2002)] e centrais [atividade neuronal, liberação de neurotransmissores, dentre outras (MONROE *et al.*, 2014; FOLEY *et al.*, 2012; MATHES *et al.*, 2010; FOLEY *et al.*, 2006)].

Em relação à atividade dopaminérgica, já foi demonstrado que animais com alta predisposição para o EF apresentam maior expressão do RNAm de receptores de DA e do autorreceptor inibitório serotoninérgico em algumas áreas cerebrais (FOLEY *et al.*, 2008), maior ativação neuronal após o EF (FOLEY *et al.*, 2012) e maior atividade dopaminérgica no estriado em comparação aos animais LCR (WATERS *et al.*, 2010). Esses estudos, em conjunto, mostram que a variação intrínseca para o EF (induzida por manipulação genética) está associada com variações na atividade do sistema dopaminérgico. Além das evidências expostas acima, Prímola-Gomes e colaboradores (2009) constataram que a variabilidade intrínseca para o EF também está presente em animais pertencentes a uma única linhagem (*Wistar*), não provenientes de manipulações genéticas. Neste estudo, os animais que apresentaram alto desempenho para a corrida tinham maior transiente de cálcio nos cardiomiócitos e maior expressão de proteínas relacionadas à contratilidade do miocárdio. Utilizando o critério de seleção proposto por Prímola-Gomes e colaboradores (2009), em trabalho desenvolvido pelo nosso laboratório, com o intuito de aprofundar o conhecimento acerca da relação entre as monoaminas e o EF, demonstramos que animais com diferenças intrínsecas no desempenho físico apresentam também diferenças monoaminérgicas. Tais alterações foram observadas em áreas cerebrais relacionadas ao controle motor [CPu (KRAVITZ

e KREITZER, 2012)] e regulação termorregulatória [área pré-óptica (ROMANOVSKY *et al.*, 2007)] no estado basal e após a realização de uma corrida na esteira a 60% da velocidade máxima. Um dos principais achados do estudo foi que animais com capacidade alta (CA) para a corrida apresentaram maior atividade dopaminérgica basal (inferida através da razão DOPAC/DA, determinada pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência) no CPu (RABELO *et al.*, 2015).

Assim, considerando os resultados encontrados acerca da atividade dopaminérgica nos animais CA e a relação entre EF crônico e neuroplasticidade, é possível especular que animais com diferenças intrínsecas para o EF desenvolvam diferentes adaptações neurais quando submetidos a um protocolo de treinamento físico aeróbico.

### **1.5 Objetivo geral do estudo**

Verificar a influência da capacidade intrínseca para o exercício físico na neuroplasticidade do sistema dopaminérgico induzida pelo treinamento físico aeróbico.

Objetivos específicos:

1. Verificar a influência da capacidade intrínseca para o exercício físico nos seguintes parâmetros:

- Concentrações basais de DA, 5-HT e seus metabólitos (DOPAC: 3,4-ácido diidroxifenilacético, 5-HIAA: 5-hidroxitriptamina) no CPu.
- Expressões do RNAm de *Bdnf*, *Gdnf*, *Th*, *Dat*, receptores *Drd1* e *Drd2* no CPu.

- Desempenho físico aeróbico: tempo de exercício, trabalho, consumo de oxigênio e eficiência mecânica.

2. Verificar a influência da capacidade intrínseca para o exercício físico nas adaptações desencadeadas pelo treinamento físico aeróbico nos seguintes parâmetros:

- Concentrações basais de DA, 5-HT e seus metabólitos no CPu.
- Expressões do RNAm de *Bdnf*, *Gdnf*, *Th*, *Dat*, receptores *Drd1* e *Drd2* no CPu.
- Desempenho físico aeróbico: tempo de exercício, consumo de oxigênio e eficiência mecânica.
- Composição corporal: massa corporal, índice de adiposidade e massa muscular.

### **1.6 Hipóteses adotadas para o estudo**

H0: A capacidade intrínseca para o exercício físico não influencia a neuroplasticidade do sistema dopaminérgico induzida pelo treinamento físico aeróbico.

H1: A capacidade intrínseca para o exercício físico influencia a neuroplasticidade do sistema dopaminérgico induzida pelo treinamento físico aeróbico.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Cuidados éticos**

Os procedimentos realizados no presente estudo obedeceram aos Princípios Éticos da Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (protocolo: 367 / 2014).

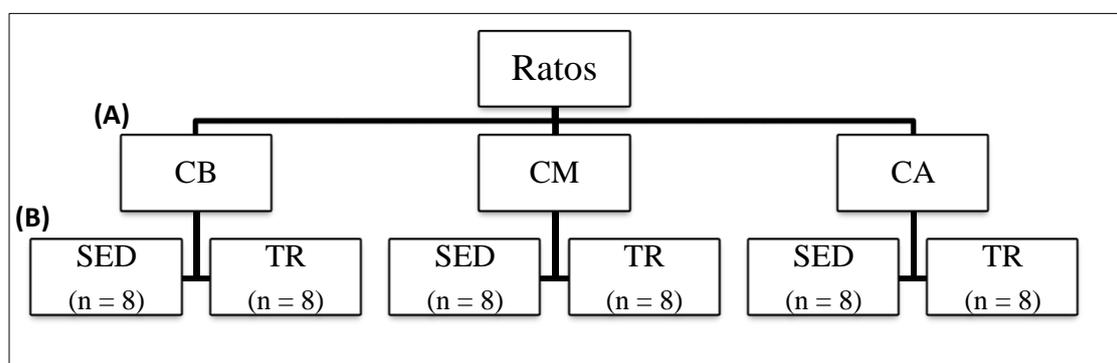
### **2.2 Amostra**

Foram utilizados ratos *Wistar* provenientes do Centro de Bioterismo do ICB da UFMG com massa corporal (MC) inicial entre 200 e 230 g. Os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), sob um ciclo claro-escuro de 14/10 h e tiveram livre acesso à ração granulada (Labina) e água. Inicialmente, os animais foram mantidos alojados em gaiolas coletivas (quatro animais por caixa), e posteriormente, durante o período de treinamento físico, eles foram transferidos para gaiolas individuais (para possibilitar o registro da ingestão alimentar – *dados não apresentados*). No decorrer de todo o experimento, os animais foram pesados a cada dois dias e os valores de MC foram utilizados como uma referência do estado de saúde.

### **2.3 Delineamento experimental**

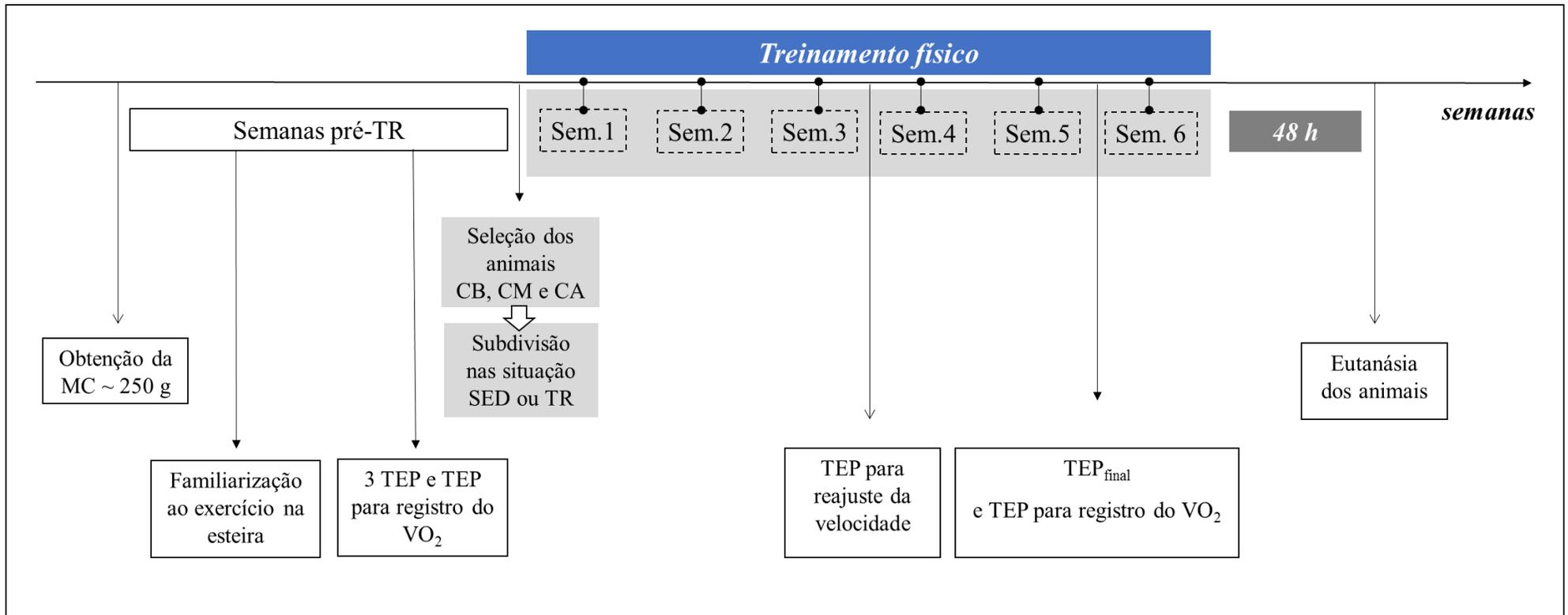
Após os animais atingirem a MC de aproximadamente 250 g, eles foram familiarizados à corrida na esteira (cujo protocolo será detalhado a seguir na

seção 2.4). Na semana seguinte, cada rato foi submetido a três testes de esforço progressivo (TEP), com um intervalo de 48 horas entre os testes. No 3º TEP também foi realizada a análise do VO<sub>2</sub>. O resultado do maior TE de cada rato foi utilizado para a classificação dos animais em: capacidade-baixa (CB), capacidade-média (CM) e capacidade-alta (CA) para o EF. Após a classificação, oito animais de cada grupo realizaram o treinamento físico aeróbico (TF) em esteira rolante [situação: treinado (TR)] e oito animais de cada grupo permaneceram sedentários no biotério [situação: sedentário (SED)] (FIG. 6). O número amostral (n= 8) foi escolhido a partir de cálculo realizado previamente, considerando o TE como a variável mais instável (*Coefficiente de variação* = 39,26%) e utilizando uma amplitude do intervalo de confiança da média (IC) de 30% (RABELO *et al.*, 2015).



**FIGURA 6 - Grupos e situações experimentais. (A) grupos; (B) situações.** Abreviações - CA: capacidade-alta; CB: capacidade-baixa; CM: capacidade-média, SED: sedentário; TR: treinado.

Na 3ª (para a readaptação da velocidade de corrida) e na 6ª semana de treinamento (para a avaliação do desempenho físico) todos os ratos foram submetidos novamente a um TEP. Na última semana de experimento, os animais também realizaram um TEP para medida do consumo de oxigênio (VO<sub>2</sub>). Quarenta e oito horas após a última sessão de treino, os animais foram eutanasiados por decapitação (FIG. 7).



**FIGURA 7 - Delineamento experimental.** Abreviações - CA: capacidade-alta; CB: capacidade-baixa; CM: capacidade-média, MC: massa corporal; SED: sedentário; TEP: teste de esforço progressivo; TEP<sub>final</sub>: teste de esforço progressivo final; TR: treinado; VO<sub>2</sub>: consumo de oxigênio.

## 2.4 Protocolo de familiarização à corrida na esteira rolante

Durante cinco dias, os animais foram familiarizados ao EF em esteira rolante (Columbus Instruments, OH, USA) permanecendo cinco minutos em repouso seguidos de cinco minutos de exercício. No decorrer da semana, a velocidade de corrida aumentou gradualmente: 10, 10, 11, 13 e 15 m/min (FIG. 8). Na parte posterior da esteira, foi aplicada uma corrente elétrica de 0,5 mA com objetivo de estimular a corrida. O objetivo da familiarização foi ensinar aos animais em qual direção correr e eliminar aqueles que não conseguiam executar a corrida (PRIMOLA-GOMES *et al.*, 2009; KOCH e BRITTON, 2001). Além disso, no estudo de Huang *et al.* (2006) foi demonstrado que uma sessão de EF sem familiarização prévia causa redução de BDNF (semelhante a resposta desencadeada pelo estresse de contenção), o que não acontece quando os animais são familiarizados previamente, por uma semana (HUANG *et al.*, 2006). Assim, com o objetivo de prevenir esse efeito nas variáveis do presente estudo, todos os animais foram familiarizados ao EF aeróbico na esteira.

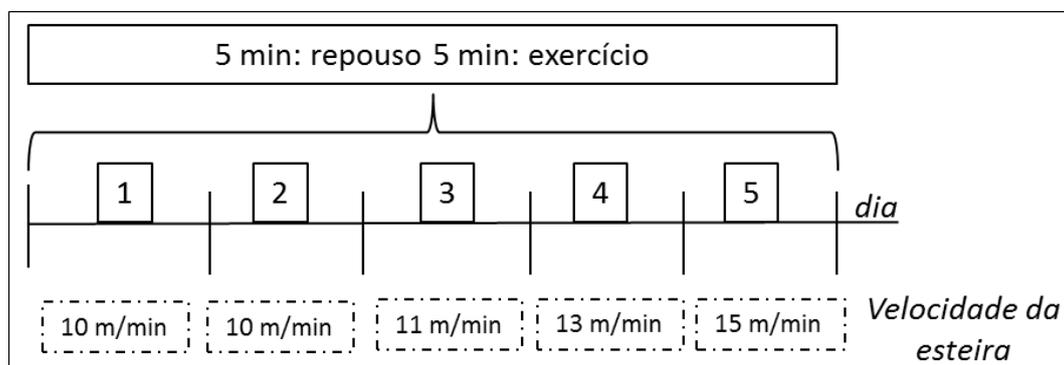


FIGURA 8 - Protocolo de familiarização a corrida na esteira.

## 2.5 Protocolo do teste de esforço progressivo

Para a realização do teste de esforço progressivo (TEP) foi adotada a velocidade inicial de 10 m/min, com acréscimos de 1 m/min a cada 3 min até a interrupção do esforço (FIG. 9). A inclinação da esteira foi mantida em 5° e, na parte posterior da mesma, foi aplicada uma corrente elétrica de 0,5 mA com objetivo de estimular o animal a correr. O critério adotado para interrupção do teste foi a permanência do animal por 10 segundos na grade de estímulo elétrico (PRÍMOLA-GOMES *et al.*, 2009). Todos os testes foram realizados no mesmo período do dia (08:00 às 13:00 h) e com a temperatura no interior da esteira controlada ( $24 \pm 1^\circ \text{C}$ ).

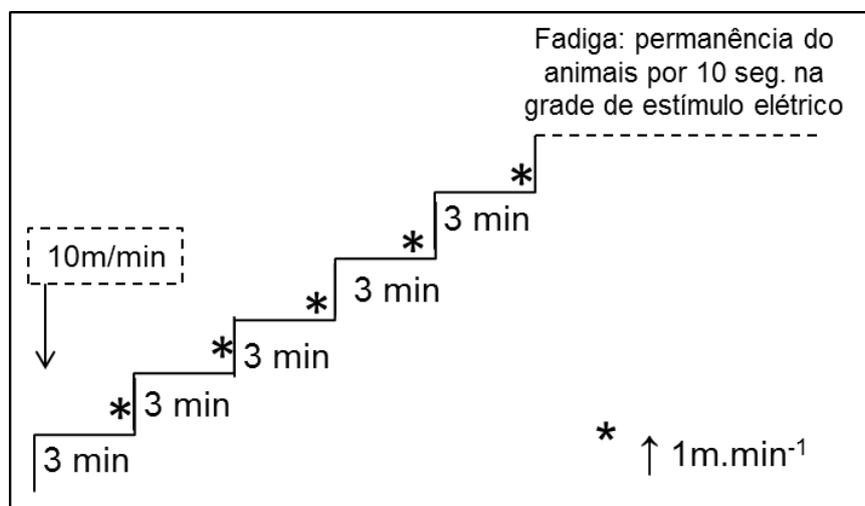
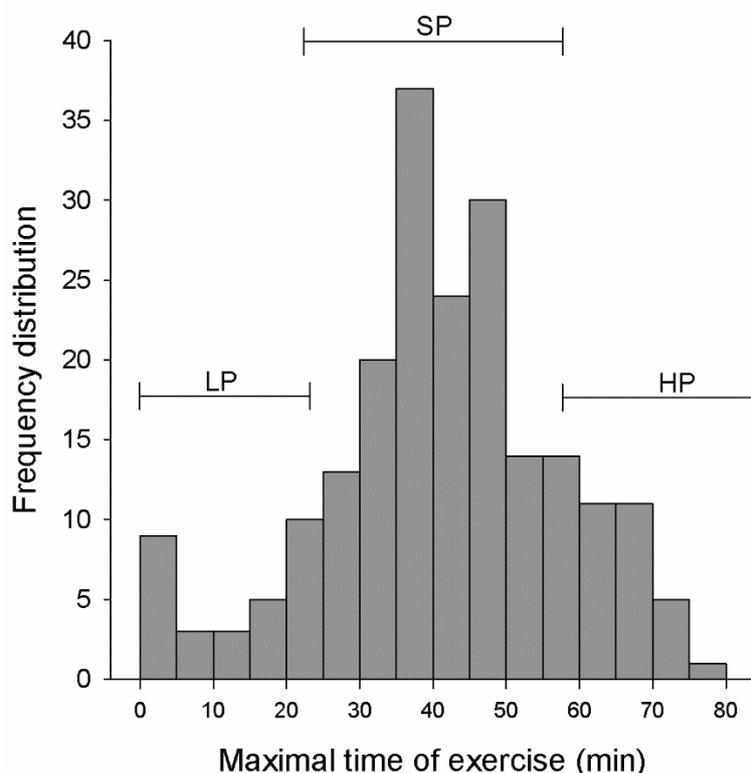


FIGURA 9 - Protocolo do teste de esforço progressivo (PRÍMOLA-GOMES *et al.*, 2009).

## 2.6 Seleção dos animais em relação à capacidade intrínseca para o exercício físico

Os animais foram classificados em relação à capacidade intrínseca para o EF a partir da comparação do tempo de exercício máximo obtido entre os 3 TEP ( $TE_{max}$ ) com a média do  $TE_{max}$  ( $mediaTE_{max}$ ) do histograma de distribuição de frequência do tempo de exercício de 210 animais submetidos ao mesmo protocolo de 3 TEP (FIG. 10; RABELO *et al.*, 2015).



**FIGURA 10 - Histograma de distribuição de frequência do tempo máximo de exercício.** 210 animais foram submetidos ao protocolo de 3 testes de esforço progressivo.  $mediaTE_{max}$ :  $41,0 \pm 16,1$  min. Abreviações - LP: low-performance; SP: standard-performance; HP: high-performance (RABELO *et al.*, 2015).

Considerando o histograma apresentado acima, os animais foram divididos conforme os critérios e valores expressos abaixo:

**TABELA 1 - Critério adotado para a seleção dos animais em relação à capacidade intrínseca para o exercício físico**

Classificação	Critério adotado	Valores de TE
CB	$TE_{max} < \text{media } TE_{max} - 1 DP$	TE < 24,90 min
CM	$\text{media } TE_{max} - 1 DP < TE_{max} < \text{media } TE_{max} + DP$	TE entre 24,90 e 57,10 min
CA	$TE_{max} > \text{media } TE_{max} + 1 DP$	TE > 57,10 min

Abreviações – CA: capacidade-alta; CB: capacidade-baixa; CM: capacidade-média; DP: desvio-padrão; TE: tempo de exercício; TE<sub>max</sub>: tempo de exercício máximo entre os três progressivos; mediaTE<sub>max</sub>: média do tempo de exercício máximo de todos os animais

(RABELO *et al.*, 2015)

## 2.7 Protocolo de treinamento físico aeróbico

O treinamento físico aeróbico proposto para o presente estudo foi desenvolvido a partir de protocolos de treinamento físico em esteira realizados previamente com ratos *Wistar* com o objetivo de induzir adaptações neurais (TAB. 2):

**TABELA 2 - Protocolos de treinamento físico com ratos propostos na literatura científica**

Autores	Protocolo de treinamento
Jia <i>et al.</i> (2014)	16 semanas, 5x/semana, 60 min, 18 m/min, 60% V <sub>max</sub> .
Dutra <i>et al.</i> (2012)	4 semanas, 5X/semana, duração inicial da corrida: 20 min, aumentos progressivos na duração até o animal conseguir correr 60 min.
Costa <i>et al.</i> (2012)	8 semanas, 5x/semana, 20 min, 60% VO <sub>2max</sub> .
Higa-Taniguchi <i>et al.</i> (2007)	3 meses, 5x/semana, 60 min, 50-60% V <sub>max</sub> .
Meeusen <i>et al.</i> (1997)	6 semanas, 5X/semana, aumentos progressivos na velocidade e duração até o animal conseguir correr por 80 min na velocidade de 26 m/min
Cechetti <i>et al.</i> (2008)	2 semanas, 5x/semana, 20min, 60% VO <sub>2max</sub> .

Abreviações – V<sub>max</sub>: velocidade máxima; VO<sub>2max</sub>: consumo máximo de oxigênio.

O treinamento físico aeróbico teve a duração de seis semanas e as sessões foram realizadas 5x/semana (segunda a sexta), no mesmo período do dia (08:00 às 13:00 h). Todos os animais iniciaram o treinamento correndo a 60% da velocidade máxima ( $V_{max}$ ) obtida nos TEP de cada grupo. Para a determinação do tempo de treino, foi utilizado como referência os resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório ao submetemos animais dos grupos CB, CM e CA a uma corrida até a fadiga a 60% da  $V_{max}$ . Os valores de TE encontrados para cada grupo estão descritos na TAB. 3.

**TABELA 3 - Dados do  $TE_{max}$  obtido a 60% da  $V_{max}$**

	<b>CB</b>	<b>CM</b>	<b>CA</b>
$TE_{max}$ a 60% $V_{max}$ (min)	49,0 ± 8,4	109,4 ± 8,3	217,9 ± 21,4

(n = 8 para cada grupo experimental). Abreviações – CA: capacidade-alta; CB: capacidade-baixa; CM: capacidade-média;  $TE_{max}$ : tempo de exercício máximo;  $V_{max}$ : velocidade máxima. Os dados estão expressos como média ± EPM.

(Rabelo *et al.*, 2015)

Com base nos dados apresentados acima, os animais realizaram o treinamento correndo 40% do tempo de corrida obtido a 60%  $V_{max}$ . Considerando que exercícios de alta intensidade são menos eficazes em promover adaptações neurais (LOU *et al.*, 2008; SOYA *et al.*, 2011; 2007), optou-se por manipular apenas a duração das sessões de treino. Assim, a cada semana (exceto na transição da 3ª para a 4ª semana) foi efetuado um acréscimo de 10% no tempo de corrida em relação à semana anterior. No final da 3ª semana de treinamento, os animais foram submetidos a um TEP e os valores de  $V_{max}$  obtidos foram utilizados para o reajuste da velocidade de treino, que se manteve a 60%  $V_{max}$  (TAB. 4). Para garantir que todos os animais fossem submetidos a um estresse de manipulação semelhante, os ratos do grupo SED foram retirados do biotério

e manipulados (retirados das gaiolas individuais e colocados na esteira por aproximadamente 10 minutos) em dias similares ao do treinamento físico.

TABELA 4 - Planilha do treinamento físico aeróbico

<u>Semana</u>	CB		CM		CA	
	Velocidade	Tempo	Velocidade	Tempo	Velocidade	Tempo
1ª sem. de TF	10 m/min	20 min	13 m/min	44 min	18 m/min	87 min
2ª sem de TF	10 m/min	22 min	13 m/min	48 min	18 m/min	96 min
3ª sem de TF	10 m/min	24 min	13 m/min	53 min	18 m/min	106 min
Final da 3ª sem.	TEP para o reajuste da velocidade (TEP 3ª sem.)					
4ª sem. de TF	~ 14 m/min	24 min	~ 15 m/min	53 min	~ 20 m/min	106 min
5ª sem. de TF	~ 14 m/min	26 min	~ 15 m/min	58 min	~20 m/min	117 min
6ª sem. de TF	~14 m/min	29 min	~ 15 m/min	64 min	~20 m/min	129 min
Final da 6ª sem.	TEP final					

Legenda - TEP: teste de esforço progressivo. TF: treinamento físico.

## **2.8 Protocolo para a medida do consumo de oxigênio**

O consumo de oxigênio foi medido durante o TEP (nos momentos pré e pós-treinamento) através de um sistema de calorimetria indireta composto por um sistema de fornecimento e troca de ar (modelo: LE400, Panlab, Harvard Apparatus) acoplado a uma esteira para animais de pequeno porte (modelo LE8700, Panlab, Harvard Apparatus). O equipamento foi calibrado semanalmente com uma mistura de gases conhecida (*High O<sub>2</sub>* = 49,99%; *High CO<sub>2</sub>*: 1,50%; *Low O<sub>2</sub>* = 20,00%; *Low CO<sub>2</sub>* = 0,00%). Nos dias dos experimentos, o animal foi posicionado dentro da esteira que permaneceu vedada durante toda a corrida. O fluxo de ar de 2 litros/min foi mantido no equipamento durante todos os testes. As variáveis respiratórias foram registradas a cada minuto através do *software Metabolism* (versão 2.2.01, Panlab, Harvard Apparatus).

## **2.9 Eutanásia**

Os animais foram eutanasiados por decapitação, 48 h após a última sessão de treinamento ou após permanecerem sedentários no biotério (de acordo com o grupo experimental). Após a eutanásia, o encéfalo da calota craniana, congelado com nitrogênio e colocado na matriz para secção cerebral de ratos (Insight Equipamentos Científicos). Foram realizadas secções no plano coronal e o CPU foi dissecado entre +1,7 e 0,7 mm em relação ao bregma (FIG. 11; Paxinos e Watson, 1998).



## **2.10 Análise das monoaminas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa**

As concentrações de DA, 5-HT e seus metabólitos (DOPAC e 5-HIAA) no CPU foram medidas através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (CLAE). Para a execução da técnica, foi utilizado um sistema de cromatografia (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) composto por uma coluna de carbono 18 (250 x 4 mm, Purospher; 5 µm, Merck, Darmstadt, Germany) precedida por uma pré-coluna da mesma constituição. O potencial elétrico aplicado foi de 850 mV sobre o eletrodo de referência de Ag/AgCl. A fase móvel foi constituída por: 100 mM de dihidrogenofosfato de sódio monohidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 10 mM de cloreto de sódio (NaCl), 0,1 mM de EDTA, 0,14 mM de ácido octanosulfônico, 90% de água MiliQ e 10% de metanol. O pH foi ajustado em 3,5 através do ácido orto-fosfórico 85%. A solução foi filtrada em uma membrana de éster de celulose (0,22 µm de poro, 47 mm de diâmetro, Millipore, SP, Brasil) e inserida no sistema a um fluxo de 1 mL/min. O CPU foi homogeneizado em 800 µL de uma solução contendo 0,15 M de ácido perclórico com 0,1 mM de EDTA. O padrão interno 3,4 dihidroxibenzilamina (DHBA - Aldrich, Milwaukee, MI, EUA) foi acrescentado à solução na concentração de 12,5 pg/µL. Após a sonicação do tecido, a solução foi centrifugada por 20 min a 12000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore (0,22 µm de poro; 13 mm; não estéril, Millex, SP, Brasil) e 20 µL de cada amostra foi injetado no sistema. A identificação e quantificação de cada pico foram realizadas através da comparação com curva padrão (12,5; 25 e 50 pg/µL de cada padrão). Para relativizar a quantidade de neurotransmissor pela quantidade de tecido cerebral,

as proteínas de cada amostra foram quantificadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Desta forma, todos os dados de monoaminas foram expressos em pg/ $\mu$ g de proteína.

Todas as amostras foram mensuradas na mesma análise. O coeficiente de variação intra-ensaio foi menor que 5% para todos os componentes analisados. As concentrações de DA e 5-HT refletiram o conteúdo de neurotransmissores nas vesículas sinápticas, enquanto DOPAC e 5-HIAA refletiram a liberação de DA e 5-HT, respectivamente (LOOKINGLAND *et al.*, 1987; SHANNON *et al.*, 1986). As razões DOPAC/DA e 5-HIAA/5-HT foram usadas como índices de *turnover* dos neurotransmissores (indicativos da atividade de cada sistema).

## **2.11 Análise do RNAm pela técnica de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo**

### *Extração do RNA total*

Para a extração do RNA total, cada alíquota de tecido cerebral (CPu) foi homogeneizada com 750  $\mu$ L de TRIZOL (Invitrogen, Life Technologies). Na sequência, o RNA total foi isolado, adicionando 200  $\mu$ L de 1-bromo-3-cloropropano (BCP, Ambion, Life Technologies), seguindo pela centrifugação da solução a 12000 x g, 4°C durante 15 min. O RNA total, presente no sobrenadante, foi transferido para um novo microtubo e 650  $\mu$ L de isopropanol 100% foi acrescentado. A solução foi centrifugada a 12000 x g a 4°C durante 35 min. Após a remoção do sobrenadante, o RNA total foi lavado (2x) com etanol a 75% e centrifugado (2x) a 12000 x g, 4°C por 15 min. O RNA foi ressuspendido

em 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC, Invitrogen, Life Technologies). Aproximadamente 20  $\mu\text{L}$ , relação de 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , de RNA foram tratados com 10% do volume de 10x tampão Turbo DNase (Ambion, Life Technologies) e 1  $\mu\text{L}$  da Turbo DNase (Ambion, Life Technologies). Após as amostras serem incubadas a 37°C por 30 min, o reagente de inativação da DNase (Ambion, Life Technologies) foi acrescentado (volume correspondente a 10% do total). As amostras foram centrifugadas novamente (10000 x  $g$  a 4°C durante 2 min) e o sobrenadante transferido para outro microtubo.

#### *Transcrição reversa*

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de RNA. Neste, foi acrescentado um mix contendo: 1  $\mu\text{L}$  de random primers (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen, Life Technologies), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (10 mM) (Invitrogen, Life Technologies) e água DEPC para o volume final de 13  $\mu\text{L}$ . A solução foi incubada a 65°C por 5 min e 4°C por 1 min. Foi acrescentado 7  $\mu\text{L}$  do mix contendo: 4  $\mu\text{L}$  de 5x PCR buffer, 1  $\mu\text{L}$  de DTT (0,1 M) (Invitrogen, Life Technologies), 1  $\mu\text{L}$  do inibidor de ribonuclease (40 U/ $\mu\text{L}$ ) (Invitrogen, Life Technologies) e o 1  $\mu\text{L}$  da *Superscript III RT* (200 U/uL, SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Life Technologies). As amostras foram incubadas à 25°C por 5 min; 50°C por 50 min e 70°C por 15 min.

#### *Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo (qPCR)*

O cDNA foi utilizado para o PCR quantitativo em tempo real. Os primers utilizados foram desenhados no Gen Bank (National Institutes of Health, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov), TAB. 5). O normalizador, usado no presente estudo, foi o

RNA ribossômico 18S. Em cada poço da placa de 96 poços foram acrescentados: 1 µg do cDNA, o *forward primer* e o *reverse primer* (300 nM para o gene de interesse e 50nM para o 18S) e 12,5 µL de *Sybr Greener qPCR Universal* (Invitrogen, Life Technologies). Os ciclos de temperatura selecionados estavam de acordo com as instruções do fabricante do *Sybr Greener* (50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por 60 seg). Os ensaios foram realizados em um termociclador *15 thermal-Cycler* (Bio-rad Laboratories Hercules). As análises das amostras foram realizadas em duplicatas.

TABELA 5: Desenho dos *primers*

Gene	Referência na NCBI:		Sequência dos primers
<i>Rattus Drd1</i>	NM_012546.3	<i>Forward primer</i>	5' GCATGGCTTGGATTGCTACG 3'
		<i>Reverse primer</i>	5' CCAGTTGCTGCCTGGACTAA 3'
<i>Rattus Drd2</i>	NM_012547.1	<i>Forward primer</i>	5' CTGGAAGCCTCGAGCAGC 3'
		<i>Reverse primer</i>	5' GTGGATCCATTGGGGCAGTG 3'
<i>Rattus Dat</i>	NM_012694.2	<i>Forward primer</i>	5' GGTTTGGAGTGCTGATTGCC 3'
		<i>Reverse primer</i>	5' TGGAGGTGGTGATGATTGCG 3'
<i>Rattus Th</i>	NM_012740.3	<i>Forward primer</i>	5' TGTGTCCGAGAGCTTCAATG 3'
		<i>Reverse primer</i>	5' GTCAATGGCCAGTGTGTACG 3'
<i>Rattus Bdnf</i>	NM_001270630.1	<i>Forward primer</i>	5' GGACATATCCATGACCAGAAAGAAA 3'
		<i>Reverse primer</i>	5' GCAACAAACCACAACATTATCGAG 3'
<i>Rattus Gdnf</i>	NM_019139.1	<i>Forward primer</i>	5' ACCAGTGACTCCAATATGCCCGAA 3'
		<i>Reverse primer</i>	5' CAGTCTTTTGATGGTGGCTTGAATA 3'

Legenda - *Bdnf*: fator neurotrófico derivado do cérebro; *Dat*: transportador de DA; *Drd1*: receptor dopaminérgico D1; *Drd2*: receptor dopaminérgico D2; *Gdnf*: fator neurotrófico derivado da glia; *Th*: tirosina hidroxilase.

## 2.12 Variáveis

- Variáveis controladas:
  - Temperatura no interior da esteira (°C): foi controlada em  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  com a utilização de um ar condicionado.
  
- Variáveis medidas:
  - Massa corporal (g): foi registrada a cada dois dias através da utilização de uma balança de precisão de 0,5 g (Filizola, Belo Horizonte, MG, Brasil).
  
  - Tempo de exercício (min): tempo entre o início do exercício e a fadiga. Foi utilizado com parâmetro de desempenho físico e registrado através da utilização de um cronômetro.
  
  - Consumo de oxigênio ( $\text{mLO}_2/\text{kg}\cdot\text{min}$ ): o valor do consumo de oxigênio ( $\text{mL}/\text{min}$ ), obtido pela calorimetria indireta, foi dividido pela massa corporal (kg) de cada animal.
  
- Variáveis calculadas:
  - Trabalho (W, kgm): o trabalho foi calculado durante os testes progressivos através da seguinte equação:

$$W = V \cdot TE \cdot \text{sen } \theta \cdot MC$$

Onde:

W = trabalho (kgm);

V = velocidade (m/min);

TE = tempo de exercício (min);

Sen  $\theta$  = seno do ângulo de inclinação da esteira (seno 5 = 0,087);

MC (kg) = massa corporal.

- Eficiência mecânica: a eficiência mecânica foi calculada através da seguinte equação:

$$EM = (W / VO_2) \times 100$$

Onde:

EM = eficiência mecânica (%);

W= trabalho (kcal);

VO<sub>2</sub> = consumo de oxigênio (kcal);

Para o cálculo da eficiência mecânica foram feitas as seguintes conversões de unidades:

Trabalho de **kgm** para **kcal**, considerando que:

$$W \text{ (kcal)} = W \text{ (kgm)} / 426,4$$

Consumo de oxigênio de **L/min** para **kcal**, considerando que:

$$VO_2 \text{ (kcal)} = VO_2 \text{ (L/min)} * 5,05$$

(MCARDLE *et al.*, 2003)

- Variação percentual do desempenho: a variação percentual do TE foi calculada a partir da equação descrita abaixo:

$$\text{Variação} = [\% = (TE_{\text{final}} - TE_{\text{inicial}} / TE_{\text{inicial}}) * 100]$$

Onde:

TE<sub>final</sub>: TE obtido no TEP final;

TE<sub>inicial</sub>: TE obtido no TEP no início do experimento.

- Concentração de neurotransmissores e metabólitos (pg/μg de proteína): os valores obtidos em pg/μL, através da técnica de CLAE, foram divididos pela quantidade de proteína de cada amostra (valores obtidos em μg/μL), determinada pelo método Bradford (BRADFORD, 1976).

- Índice de adiposidade (IA em %): o IA foi calculado através da equação descrita abaixo:

$$IA (\%) = (TAE + TAM + TAR) \times 100 / MC$$

Onde:

TAP: tecido adiposo epididimal;

TAM: tecido adiposo mesentérico;

TAR: tecido adiposo retroperitoneal;

MC: massa corporal.

(LACERDA *et al.*, 2015)

- Expressão de RNAm: para a obtenção dos valores de RNAm relativo, foram utilizados os valores de ciclos de temperatura (CT). O valor de  $\Delta CT$  foi determinado pela subtração do valor de CT do gene alvo e o normalizador de cada amostra (18S). A média de  $\Delta CT$  do grupo CM sedentário (utilizado como calibrador) foi subtraída de cada valor de  $\Delta CT$ , obtendo assim  $\Delta\Delta CT$ . A expressão gênica foi encontrada pelo cálculo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

### **2.13 Análise Estatística**

Inicialmente foram verificadas a normalidade e homocedasticidade dos dados através dos testes de *Shapiro-Wilke* e *Levene*.

Nas comparações iniciais (antes do período de 6 semanas) das variáveis MC,  $TE_{max}$ , TE (1º progressivo), TE (2º progressivo), TE (3º progressivo), trabalho,  $VO_2$ , EM e distância percorrida durante o TF foi usada ANOVA one-way [fonte de variação (FV): capacidade]. Para as comparações de TE entre os três testes do TEP, em cada grupo experimental, foi utilizada uma ANOVA one-way [FV: tempo]. Nas comparações finais (após o período de 6 semanas) das variáveis MC, massa do músculo gastrocnêmio, massa do músculo sóleo, IA, TE, trabalho,  $VO_2$  e EM, variação % do TE, concentrações de monoaminas e expressões do RNAm foi utilizado ANOVA two-way [FV: capacidade e situação (SED ou TR)]. Nos casos em que foi observado um valor significativo de  $F$ , foi aplicado um teste *post-hoc* adequado ao coeficiente de variação da variável e ao delineamento experimental. Para avaliar a força de associação entre TE inicial e  $\Delta TE$  foi utilizada a correlação de Pearson e a análise de regressão linear. O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 5\%$  (SAMPAIO, 2007). O programa estatístico utilizado foi o Sigma Plot 11.0.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Seleção e caracterização dos animais com diferenças na capacidade intrínseca para o exercício físico

Para a realização do presente estudo, 192 ratos foram submetidos ao TEP. A partir dos dados de  $TE_{max}$  obtidos entre os testes progressivos e tendo como referência os resultados presentes no histograma desenvolvido anteriormente em nosso grupo por Rabelo *et al.* (2015), os animais foram classificados em capacidade-baixa (CB, n = 16), capacidade-média (CM, n = 16) e capacidade-alta (CA, n = 16) para a corrida. Os outros 144 animais que não foram selecionados para o experimento foram direcionados para outras pesquisas do laboratório. No dia do 1º TEP, conforme demonstrado na TAB. 6, não foram observadas diferenças na MC entre os animais CB, CM e CA.

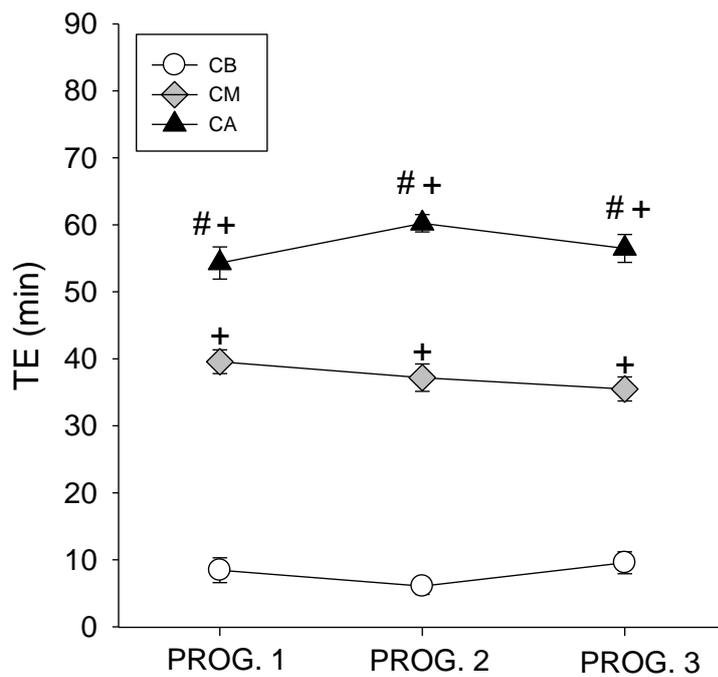
**TABELA 6 - Massa corporal no 1º TEP dos animais CB, CM e CA**

	CB	CM	CA
MC inicial (g)	288,7 ± 4,2	276,2 ± 4,1	280,2 ± 4,5

Os dados estão expressos como média ± EPM (n = 16 em cada grupo). (P = 0,11). ANOVA one-way.

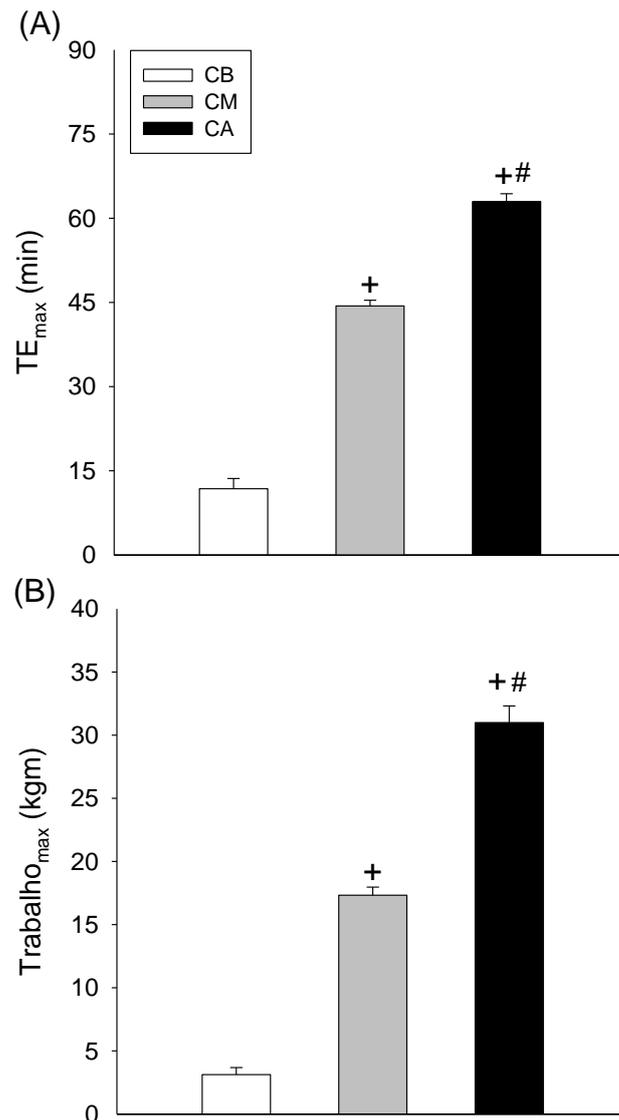
No presente estudo, assim como em trabalhos prévios da literatura (PRÍMOLA-GOMES *et al.*, 2010; KOCH e BRITTON, 2001), o maior valor de TE obtido entre os testes progressivos foi utilizado como referência para determinação da capacidade intrínseca de corrida (FIG. 13). Segundo Koch e Britton (2001) a utilização do maior valor como referência visa minimizar a interferência de variáveis ambientais que podem influenciar de forma negativa no desempenho

físico. No entanto, conforme demonstrado na FIG. 12, o desempenho em cada grupo se mostrou consistente, não variando de forma significativa entre os testes progressivos. Além disso, em cada teste progressivo, o TE foi maior nos animais CA quando comparados ao CM e CB e maior nos animais CM em relação ao grupo CB ( $P < 0,001$  para todas as comparações).



**FIGURA 12: Desempenho nos três TEP entre os grupos CB, CM e CA.** CB - PROG. 1:  $8,4 \pm 1,8$ ; PROG. 2:  $6,0 \pm 1,2$ ; PROG. 3:  $9,5 \pm 1,6$  min; CM – PROG 1: 39,5; PROG. 2: 37,1; PROG. 3: 35,5 min; CA – PROG 1: 54,3; PROG. 2: 60,2; PROG. 3: 56,4 min ( $P < 0,001$  para todas as comparações). +Diferença em relação ao CB, # Diferença em relação ao CM. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 16$  para cada grupo). ANOVA one-way (fonte de variação: número do progressivo). ANOVA one-way (fonte de variação: capacidade intrínseca para o EF).

Como esperado, o  $TE_{max}$  e o trabalho máximo realizado entre os três testes progressivos também diferiram entre os três grupos experimentais ( $CB < CM < CA$ ;  $P < 0,001$ ; FIG. 13).



**FIGURA 13 - TE<sub>max</sub> e Trabalho<sub>max</sub> entre os grupos CB, CM e CA. (A) TE<sub>max</sub> - CB: 11,8 ± 1,8; CM: 44,4 ± 1,0; CA: 62,9 ± 1,4 min. (B) Trabalho<sub>max</sub> - CB: 3,1 ± 0,5; CM: 17,3 ± 0,6; CA: 31,0 ± 1,3 kgm ( $P < 0,001$  para todas as comparações). + Diferença em relação ao CB, # Diferença em relação ao CM. Os dados estão expressos como média ± EPM (n = 16 para cada grupo). ANOVA one-way.**

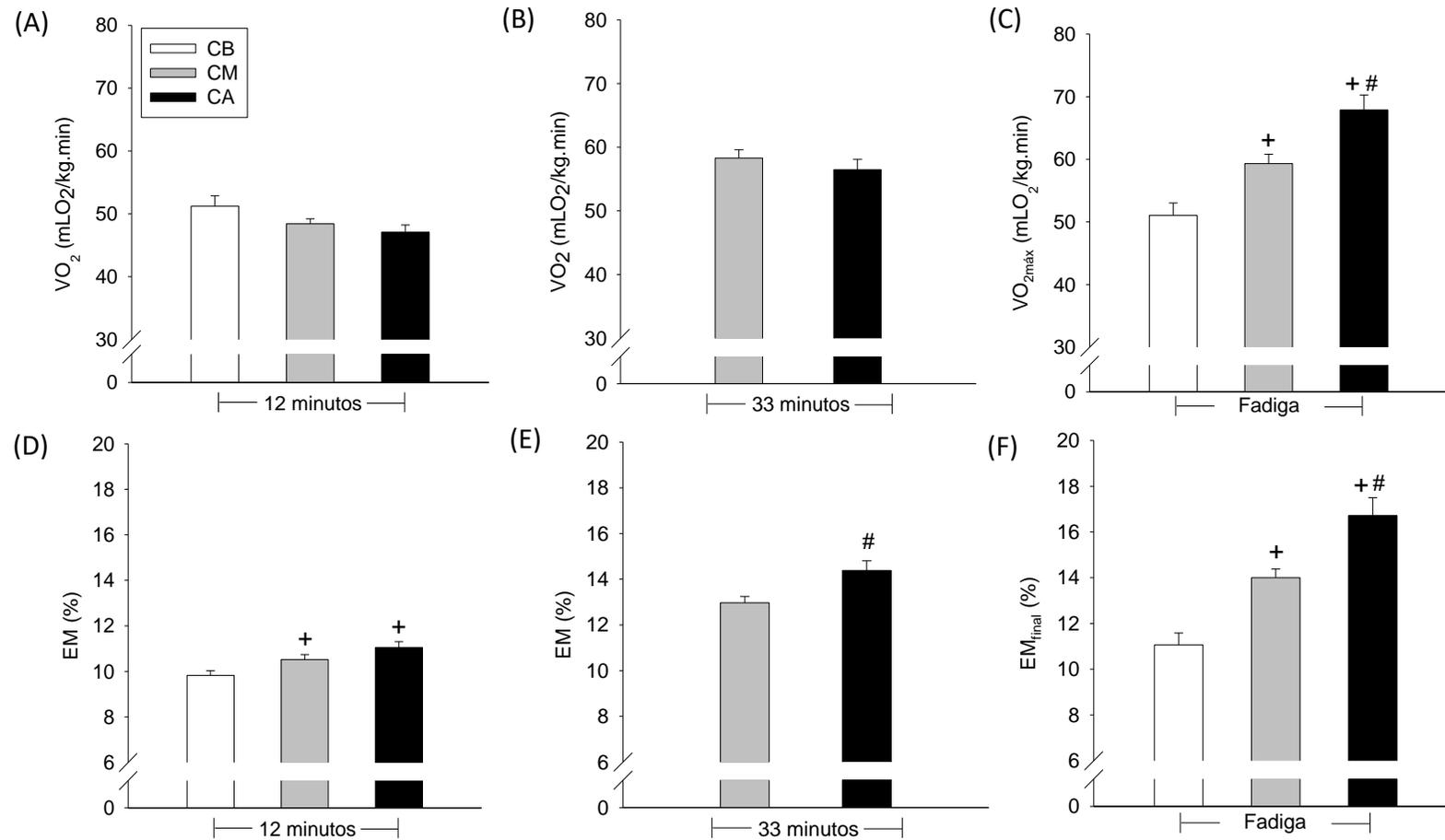
No último TEP do protocolo de seleção, foi efetuado o registro do consumo de oxigênio. Neste teste, o menor TE do grupo CB foi 12 min e do grupo CM foi 33 min (TAB. 7). Devido as diferenças no tempo de corrida entre grupos, o VO<sub>2</sub> e a EM foram comparados no 12<sup>o</sup> e 33<sup>o</sup> min. Além disso, a comparação também foi efetuada no final do teste, resultando nos valores de consumo máximo de oxigênio (VO<sub>2max</sub>) e eficiência mecânica (EM<sub>fadiga</sub>) (FIG. 14).

**TABELA 7 – Tempo de exercício no teste progressivo para a medida do VO<sub>2</sub> nos grupos CB, CM e CA**

	CB	CM	CA
TE (min)	16,8 ± 1,4	36,9 ± 1,2 +	51,7 ± 2,4 + #

+ Diferença em relação ao CB. # Diferença em relação ao CM. Os dados estão expressos como média ± EPM.  $P < 0,001$ . (n = 14 para cada grupo). ANOVA one-way.

Nos minutos 12 e 33, o VO<sub>2</sub> não diferiu entre os grupos experimentais, porém, o VO<sub>2max</sub> foi maior no grupo CA quando comparado aos grupos CB e CM e maior no grupo CM em relação ao CB ( $P < 0,01$ ; FIG. 14C). A EM, nos 12 min., foi maior nos animais CA e CM quando comparados ao grupo CB ( $P < 0,05$ ; FIG. 14D). Com 33 min. de exercício, a EM do grupo CA foi maior do que CM ( $P < 0,01$ ; FIG. 14E). Já, os valores de EM<sub>fadiga</sub> diferiram entre todos os grupos experimentais (CB < CM < CA;  $P < 0,01$ ) (FIG. 14F).

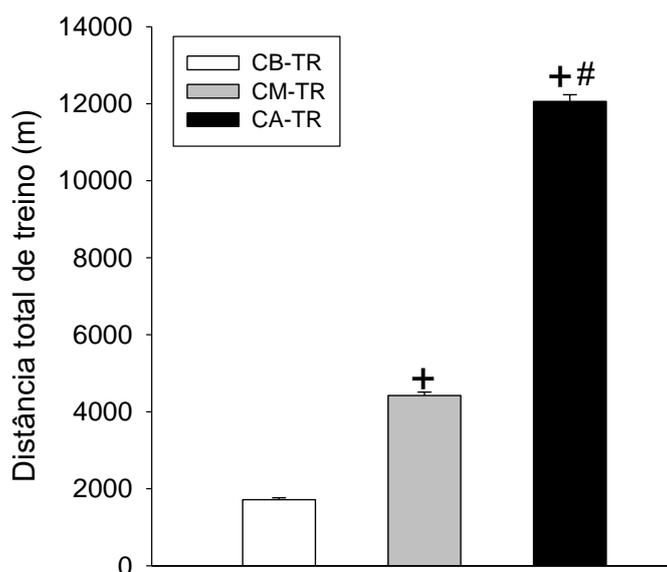


**FIGURA 14 - VO<sub>2</sub> e EM entre os grupos CB, CM e CA. (A) VO<sub>2</sub> (12 min.)** - CB: 51,2 ± 1,6; CM: 48,4 ± 0,8; CA: 47,0 ± 1,1 mL O<sub>2</sub>/kg.min. **(B) VO<sub>2</sub> (33 min.)** - CM: 58,3 ± 1,3; CA: 56,4 ± 1,6 mL O<sub>2</sub>/kg.min. **(C) VO<sub>2max</sub>** - CB: 51,0 ± 1,9; CM: 59,3 ± 1,5; CA: 65,8 ± 2,3 mL O<sub>2</sub>/kg.min. **(D) EM (12 min.)** - CB: 9,8 ± 0,2; CM: 10,5 ± 0,2; CA: 11,0 ± 0,2%. **(E) EM (33 min.)** - CM: 12,9 ± 0,2; CA: 14,3 ± 0,4%. **(F) EM<sub>fadiga</sub>** - CB: 11,0 ± 0,5; CM: 14,0 ± 0,3; CA: 16,7 ± 0,7 % ( $P < 0,01$  para as comparações de VO<sub>2max</sub>; EM – 33 min e EM<sub>final</sub>.  $P < 0,05$  para as comparações em EM – 12 min). # Diferença em relação ao CB; + Diferença em relação ao CM. (n = 14 em cada grupo). Os dados estão expressos como média ± EPM. ANOVA one-way.

Após a classificação dos animais em relação a capacidade intrínseca para o EF, eles foram aleatoriamente subdivididos nas seguintes situações experimentais: sedentários ou submetidos ao TF aeróbico por seis semanas.

### 3.2 Efeito do treinamento físico aeróbico nos animais com diferenças na capacidade intrínseca para o exercício físico

Os próximos gráficos e tabelas demonstram os dados de composição corporal, desempenho, neurotransmissores e expressões de RNAm (*Drd1*, *Drd2*, *Dat*, *Th*, *Gdnf* e *Bdnf*) nos grupos SED e TR com diferenças na capacidade intrínseca para o EF. Conforme os dados presentes na FIG. 15, as distâncias percorridas durante as seis semanas (distância total de treino), com base nos parâmetros da carga de treinamento utilizados, diferiram entre os grupos experimentais (CA-TR > CM-TR > CB-TR;  $P < 0,001$ ).



**FIGURA 15 - Distância total de treino dos grupos CB, CM e CA.** CB-TR: 1715,0 ± 51,0; CM-TR: 4422,5 ± 87,5; CA-TR: 12066,0 ± 176 m. + Diferença em relação ao CB. # Diferença em relação ao CM. (n = 8 em cada grupo). Os dados estão expressos como média ± EPM. ANOVA one-way.

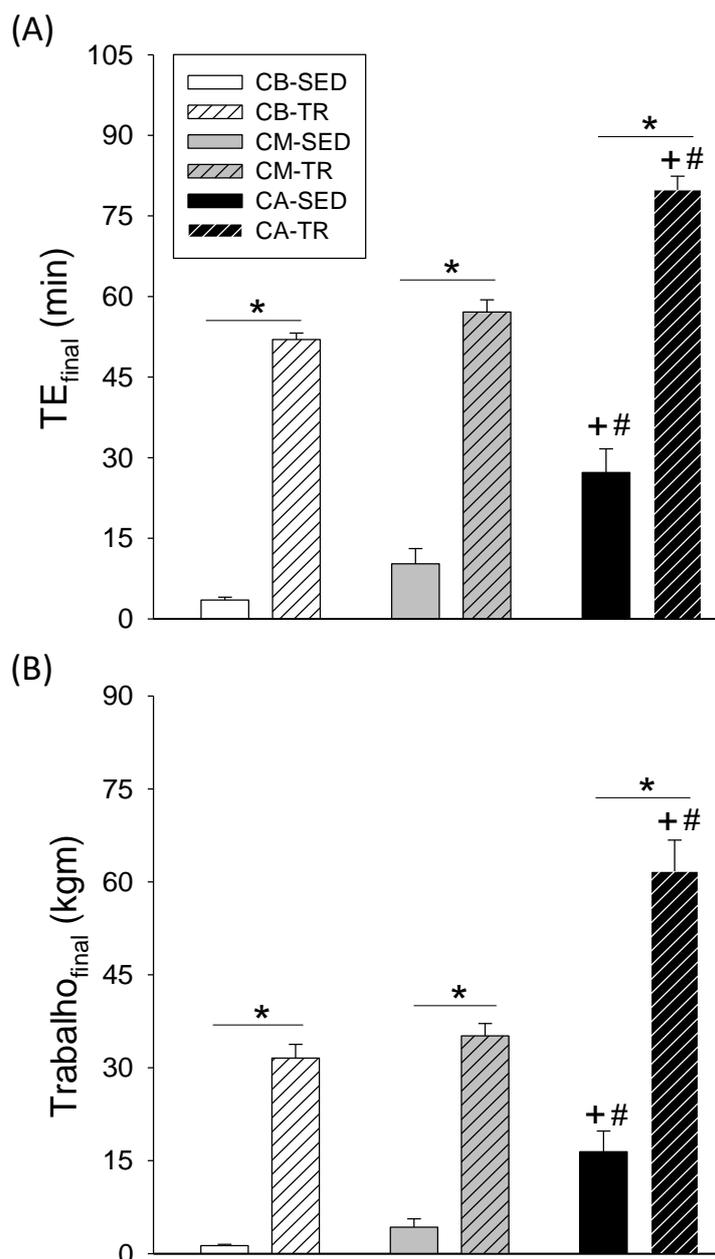
Em relação aos dados de composição corporal, conforme demonstrado na TAB. 8, no final das seis semanas de experimento, a MC foi menor nos animais CB-TR em comparação ao grupo CB-SED ( $P < 0,05$ ). Além disso, no grupo SED, o índice de adiposidade (IA) foi maior nos animais CB quando comparados ao CM e CA ( $P < 0,05$ ). Com o TF, o IA foi menor nos animais CB-TR e CM-TR em relação aos seus respectivos controles, CB-SED e CM-SED ( $P < 0,05$ ). Assim, após o TF não foram mais observadas diferenças no IA entre os grupos experimentais. A massa do músculo sóleo relativizada pela massa corporal foi maior nos animais CB-TR em relação ao CB-SED ( $P < 0,05$ )

**TABELA 8 - Dados de composição corporal nos animais CB, CM e CA sedentários e treinados**

	CB		CM		CA	
	SED	TR	SED	TR	SED	TR
MC (g)	423,5 ± 10,7	380,5 ± 16,0 *	406,6 ± 9,3	373,5 ± 10,5	405,5 ± 15,1	380,1 ± 9,8
Índice de adiposidade (%)	9,8 ± 1,0	5,5 ± 0,8 *	6,7 ± 0,7 +	4,7 ± 0,4 *	5,2 ± 0,2 +	4,3 ± 0,4
Massa do músculo sóleo relativizada pela MC (mg/g)	0,9 ± 0,04	1,1 ± 0,05 *	0,9 ± 0,03	0,9 ± 0,03	0,9 ± 0,03	1,0 ± 0,02
Massa do músculo gastrocnêmio relativizada pela MC (mg/g)	12,2 ± 0,2	13,0 ± 0,5	12,1 ± 0,2	12,6 ± 0,1	12,3 ± 0,3	12,5 ± 0,03

+ Diferença em relação ao grupo CB. # Diferença em relação ao grupo CM. \* Diferença entre SED e TR. (n = 8 em cada grupo). Os dados estão expressos como média ± EPM. ANOVA two-way.

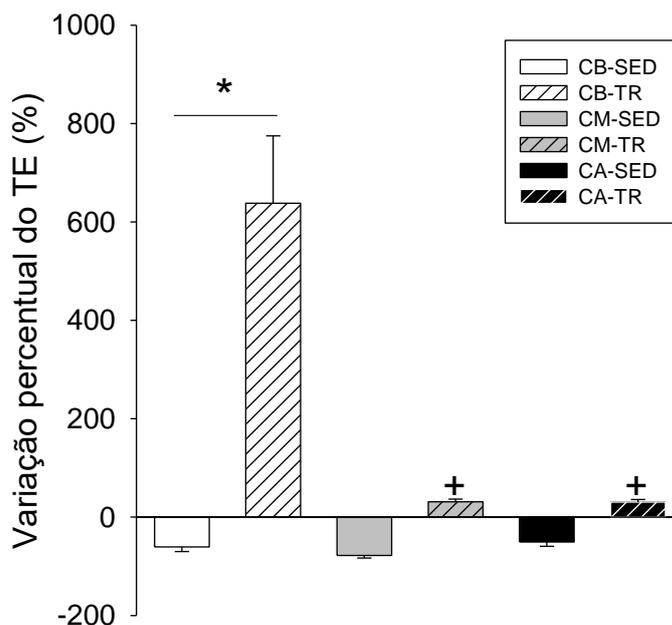
Após as 6 semanas, no TEP, o  $TE_{final}$  nos animais SED foi maior no grupo CA em relação ao CB e CM ( $P < 0,001$ ). Essa mesma resposta foi observada nos animais TR (CA-TR  $>$  CM-TR e CB-TR;  $P < 0,001$ ). Com o treinamento, o  $TE_{final}$  foi maior em todos os grupos experimentais quando comparados aos seus respectivos controles SED ( $P < 0,001$ ; FIG. 16A). Considerando a diferença observada na MC entre os grupos experimentais (CB-TR  $<$  CB-SED), o trabalho também foi calculado com base no resultado do TEP (FIG. 16B). As diferenças encontradas entre os grupos (CB, CM e CA) e situações (SED e TR) foram as mesmas observadas no TE final (CA-SED  $>$  CB-SED e CM-SED; CA-TR  $>$  CB-TR e CM-TR; CB-TR  $>$  CB-SED; CM-TR  $>$  CM-SED e CA-TR  $>$  CA-SED;  $P < 0,001$ ).



**FIGURA 16 – TE<sub>final</sub> e Trabalho<sub>final</sub> entre os grupos CB, CM e CA sedentários e treinados. (A) TE<sub>final</sub>: CB-SED: 3,5 ± 0,5; CB-TR: 52,0 ± 1,2; CM-SED: 10,2 ± 2,8; CM-TR: 57,1 ± 2,2; CA-SED: 27,2 ± 4,4; CA-TR: 79,8 ± 2,5 min. . (B) Trabalho<sub>final</sub>: CB-SED: 1,3 ± 0,2; CB-TR: 31,5 ± 2,2; CM-SED: 4,3 ± 1,3; CM-TR: 35,1 ± 1,9; CA-SED: 16,4 ± 3,3; CA-TR: 61,7 ± 5,0 kgm. + Diferença em relação ao CB. # Diferença em relação ao CM. \* Diferença em relação ao sedentário (n = 8 em cada grupo). Os dados estão expressos como média ± EPM. ANOVA two-way.**

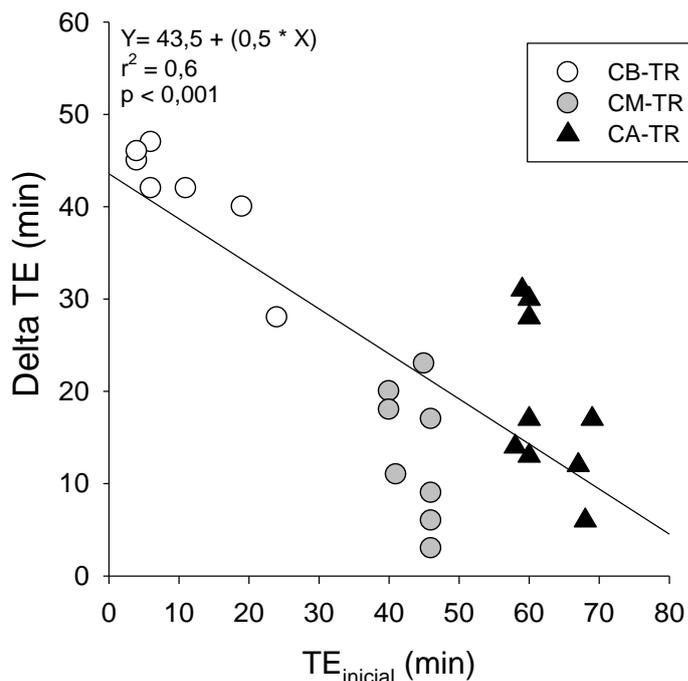
Considerando as diferenças iniciais encontradas entre os grupos em relação ao desempenho físico e com o intuito de analisar a treinabilidade dos animais, o cálculo da variação percentual do TE foi efetuado com base nos resultados do último TEP, após as seis semanas de treinamento físico aeróbico. A variação do

TE foi maior nos animais CB-TR quando comparado aos demais grupos experimentais treinados (CB-TR > CM-TR e CA-TR;  $P < 0,001$ ; FIG. 17). Além disso, a diferenças de TE entre o CB-TR e seu grupo controle (CB-SED) foi maior do que a observada nos grupos CM e CA quando comparados aos seus respectivos grupos SED ( $P < 0,001$ , FIG. 17).



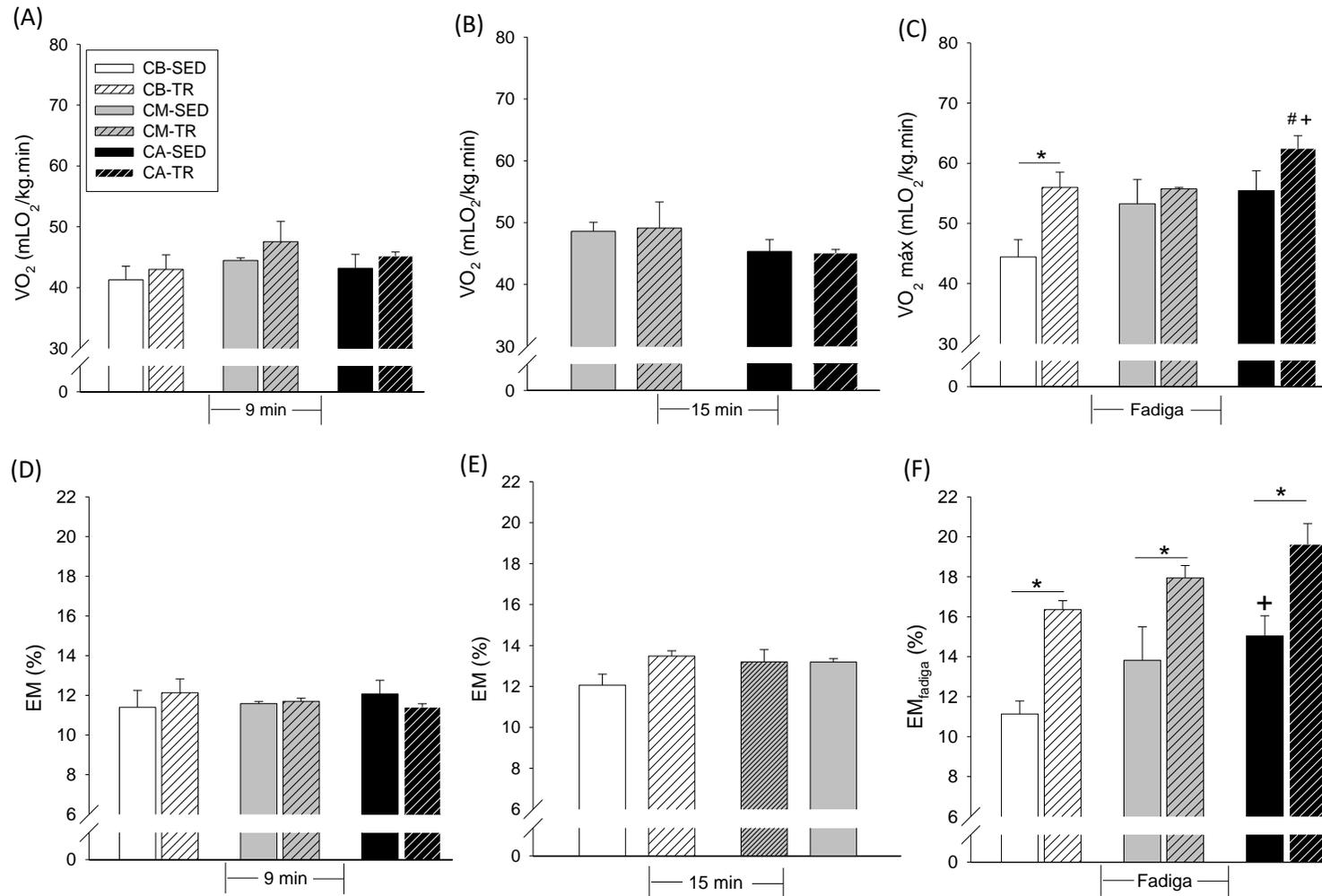
**FIGURA 17 - Variação percentual do TE entre os grupos CB, CM e CA sedentários e treinados.** CB-SED:  $60,5 \pm 9,4$ ; CB-TR:  $638,2 \pm 136,6$ ; CM-SED:  $78,0 \pm 5,2$ ; CM-TR:  $31,1 \pm 5,7$ ; CA-SED:  $50,6 \pm 8,9$ ; CA-TR:  $30,5 \pm 5,2$  % ( $P < 0,001$ ). + Diferença em relação ao CB. (n = 8 em cada grupo). \* Diferenças entre SED e TR. Os dados estão expressos como média ± EPM. ANOVA two-way.

Além das diferenças na treinabilidade, observamos que para os animais treinados o desempenho inicial se correlacionou de forma negativa com o delta TE no decorrer das seis semanas ( $r^2 = 0,6$ ;  $P < 0,001$ ; FIG. 18).



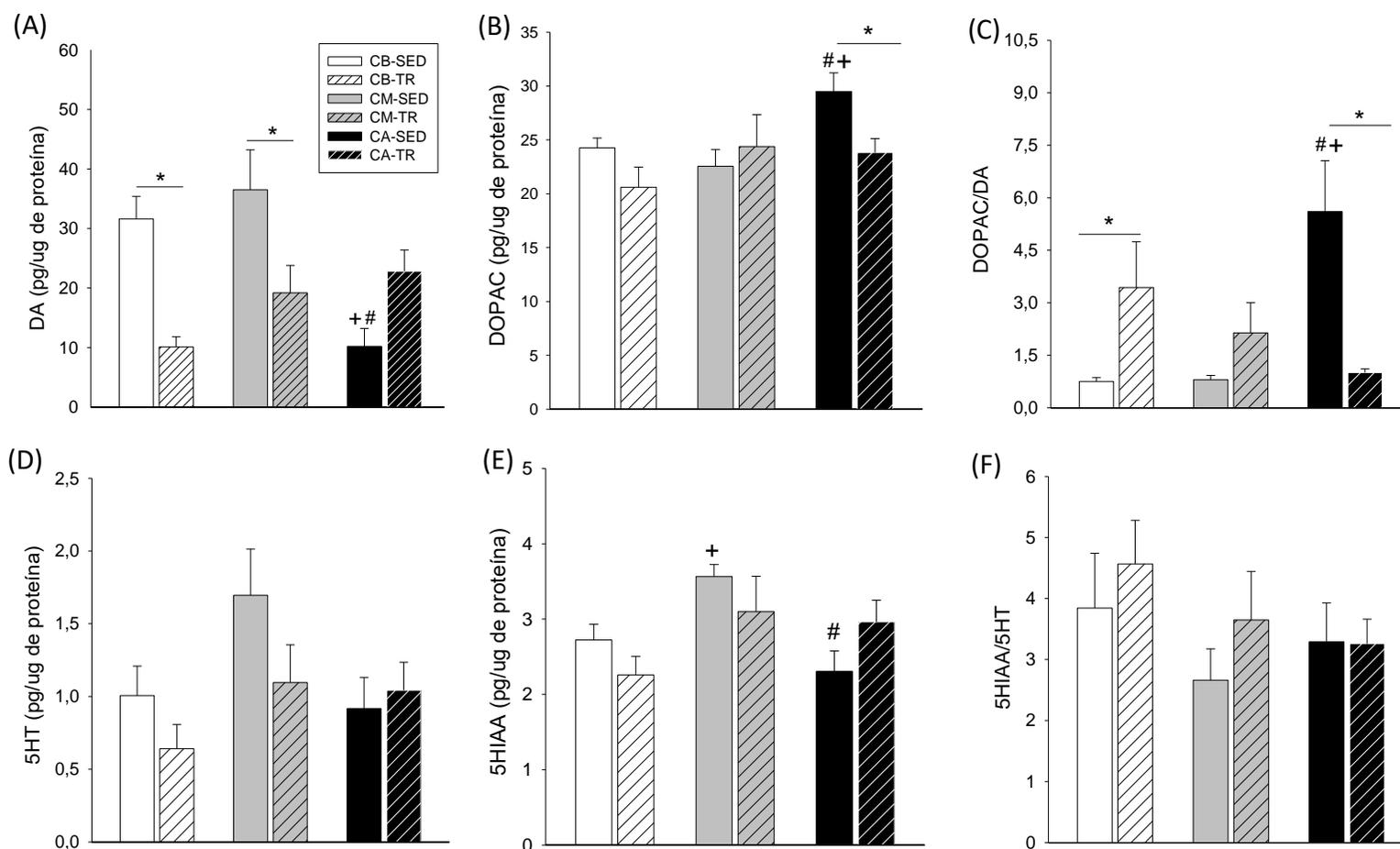
**FIGURA 18 - Correlação entre o TE<sub>final</sub> e o delta TE entre os animais CB, CM e CA treinados (n = 8 em cada grupo).**

Na última semana de experimento, todos os animais foram submetidos ao TEP para análise do  $VO_2$  e cálculo da EM. No teste, o primeiro animal a parar do grupo CB-SED parou com 9 min. Já no grupo CM-SED, o animal com menor desempenho correu por 15 min. Com isso, os dados de  $VO_2$  e EM foram comparados nos tempos 9 min (CB, CM e CA, FIG. 19A e D), 15 min (CM e CA, FIG. 19B e E) e na fadiga (FIG. 19C e F). O  $VO_{2max}$  foi maior nos animais CB-TR em relação ao CB-SED ( $P < 0,05$ ) e foi maior no CA-TR em relação ao CM-TR e CB-TR ( $P < 0,05$ ). Já a  $EM_{fadiga}$  foi maior em todos os grupos treinados quando comparados aos seus respectivos controles, sedentários. Nos grupos SED, a  $EM_{fadiga}$  foi maior nos animais CA em relação ao CB ( $P < 0,05$ ).



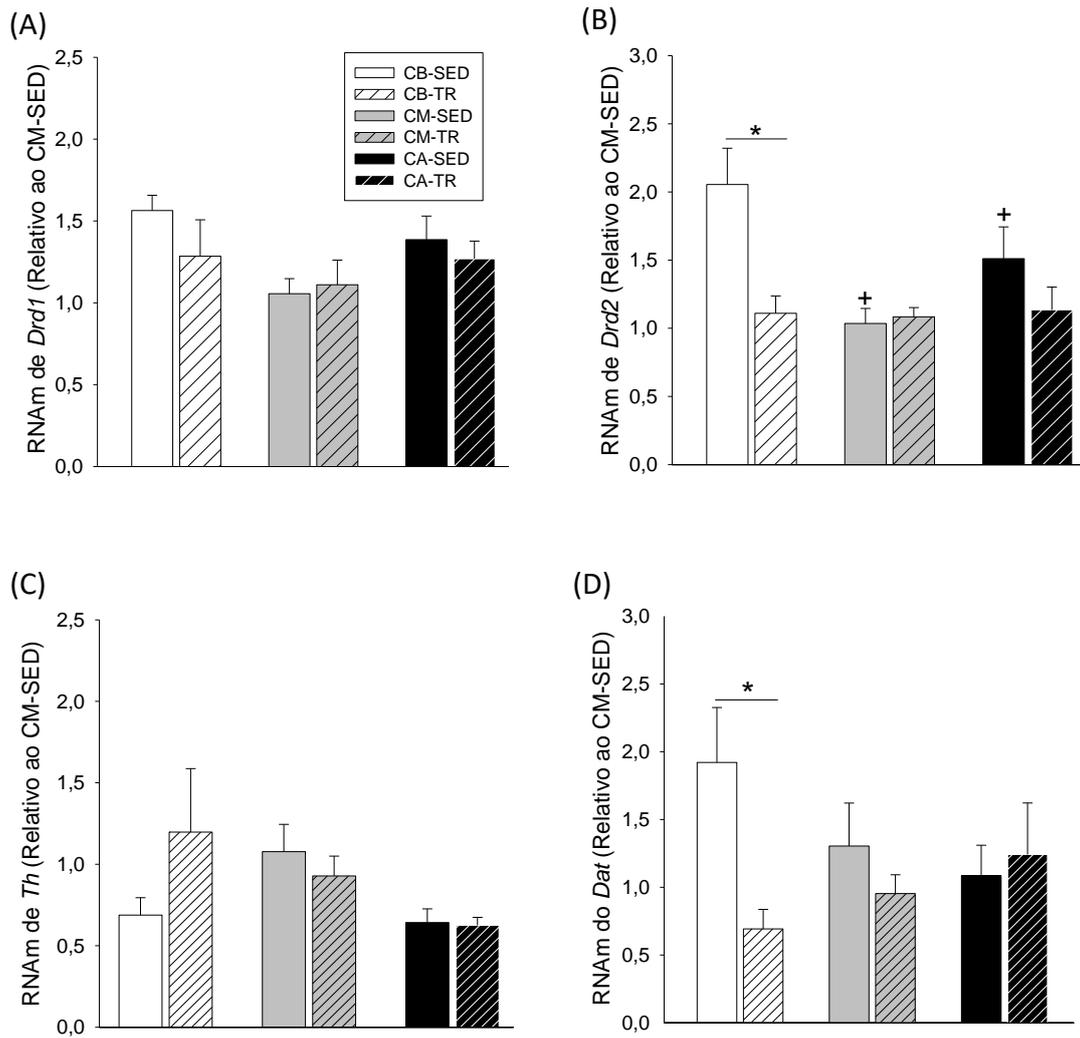
**FIGURA 19 - VO<sub>2</sub> e EM entre os grupos CB, CM e CA sedentários e treinados. (A) VO<sub>2</sub>-9 min:** CB-SED: 41,2 ± 2,2; CB-TR: 42,9 ± 2,2; CM-SED: 44,4 ± 0,4; CM-TR: 47,5 ± 3,3; CA-SED: 43,1 ± 2,3; CA-TR: 45,1 ± 0,6 mLO<sub>2</sub>/kg.min. **(B) VO<sub>2</sub>-15 min:** CM-SED: 48,5 ± 1,4; CM-TR: 49,1 ± 4,2; CA-SED: 45,3 ± 1,9; CA-TR: 45,0 ± 0,5 mLO<sub>2</sub>/kg.min. **(C) VO<sub>2</sub> máx:** CB-SED: 44,4 ± 2,8; CB-TR: 55,9 ± 2,5; CM-SED: 53,2 ± 4,0; CM-TR: 55,7 ± 0,2; CA-SED: 55,4 ± 3,3; CA-TR: 62,4 ± 2,1 mLO<sub>2</sub>/kg.min. **(D) EM-9 min:** CB-SED: 11,3 ± 0,8; CB-TR: 12,1 ± 0,7; CM-SED: 11,5 ± 0,1; CM-TR: 11,6 ± 0,1; CA-SED: 12,0 ± 0,6; CA-TR: 11,4 ± 0,1%. **(E) EM-15 min:** CM-SED: 12,0 ± 0,5; CM-TR: 13,4 ± 0,2; CA-SED: 13,2 ± 0,6; CA-TR: 13,2 ± 0,2%. **(F) EM<sub>fatiga</sub>:** CB-SED: 11,1 ± 0,6; CB-TR: 16,4 ± 0,4; CM-SED: 13,8 ± 1,6; CM-TR: 17,9 ± 0,6; CA-SED: 15,0 ± 1,0; CA-TR: 19,4 ± 1,0% (*P* < 0,05 para todas as comparações). +Diferença em relação ao CB. #Diferença em relação ao CM. \*Diferença em relação ao grupo sedentário. (n = 7 para cada grupo experimental). Dados estão expressos como média ± EPM. ANOVA two-way.

Os resultados presentes na FIG. 20 representam as diferenças intrínsecas e decorrentes do TF aeróbico por seis semanas nas concentrações dos neurotransmissores DA e 5-HT e seus respectivos metabólitos (DOPAC e 5-HIAA) no CPu. A razão entre o metabólito e seu neurotransmissor também foi calculada e utilizada como um parâmetro de *turnover* dos sistemas monoaminérgicos. Conforme demonstrado abaixo, nos animais SED, a concentração de DA foi menor no grupo CA em relação ao CB e CM ( $P < 0,05$ ). Além disso, o TF diminuiu a concentração de DA nos animais CB e CM ( $P < 0,05$ ; FIG. 20A). A concentração de DOPAC foi maior nos animais CA-SED em relação ao CM-SED e CB-SED ( $P < 0,05$ ; FIG. 20B). No entanto, com o treinamento, ocorreu diminuição na concentração de DOPAC no grupo CA (CA-TR < CA-SED;  $P < 0,001$ ). A razão DOPAC/DA foi maior nos animais CA-SED quando comparados ao CM-SED e CB-SED ( $P < 0,001$ ). Em resposta ao treinamento, houve aumento da razão DOPAC/DA no grupo CB ( $P < 0,05$ ) e diminuição no grupo CA ( $P < 0,05$ ; FIG. 20C). Já em relação as variáveis do sistema serotoninérgico, a concentração do metabólito 5-HIAA foi maior nos animais CM-SED em relação ao CB-SED e CA-SED ( $P < 0,05$ ; FIG. 20E).



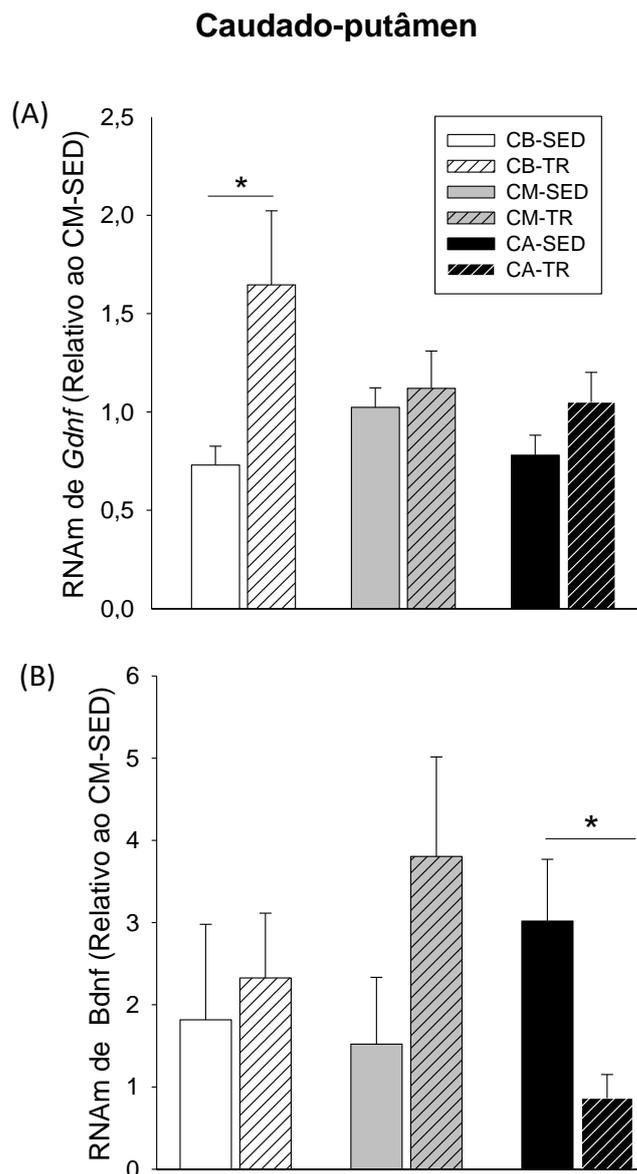
**FIGURA 20 - Variáveis dopaminérgicas e serotoninérgicas, no CPu, entre os grupos CB, CM e CA sedentários e treinados. (A) DA:** CB-SED:  $31,6 \pm 4,0$ ; CB-TR:  $12,5 \pm 2,9$ ; CM-SED:  $36,4 \pm 7,1$ ; CM-TR:  $19,1 \pm 4,8$ ; CA-SED:  $10,2 \pm 3,1$ ; CA-TR:  $22,7 \pm 3,7$  pg/ug de proteína. **(B) DOPAC:** CB-SED:  $24,2 \pm 0,9$ ; CB-TR:  $20,6 \pm 1,8$ ; CM-SED:  $22,5 \pm 1,5$ ; CM-TR:  $24,4 \pm 2,9$ ; CA-SED:  $29,5 \pm 1,7$ ; CA-TR:  $23,8 \pm 1,3$  pg/ug de proteína. **(C) DOPAC/DA:** CB-SED:  $0,7 \pm 0,1$ ; CB-TR:  $3,4 \pm 1,3$ ; CM-SED:  $0,8 \pm 0,1$ ; CM-TR:  $2,1 \pm 0,8$ ; CA-SED:  $5,6 \pm 1,4$ ; CA-TR:  $1,0 \pm 0,1$ . **(D) 5-HT:** CB-SED:  $1,0 \pm 0,2$ ; CB-TR:  $0,6 \pm 0,1$ ; CM-SED:  $1,7 \pm 0,3$ ; CM-TR:  $1,1 \pm 0,2$ ; CA-SED:  $0,9 \pm 0,2$ ; CA-TR:  $1,0 \pm 0,1$  pg/ug de proteína. **(E) 5-HIAA:** CB-SED:  $2,7 \pm 0,2$ ; CB-TR:  $2,2 \pm 0,2$ ; CM-SED:  $3,5 \pm 0,1$ ; CM-TR:  $3,1 \pm 0,4$ ; CA-SED:  $2,3 \pm 0,3$ ; CA-TR:  $2,9 \pm 0,3$  pg/ug de proteína. **(F) 5-HIAA/5-HT:** CB-SED:  $3,8 \pm 0,8$ ; CB-TR:  $4,5 \pm 0,7$ ; CM-SED:  $2,6 \pm 0,5$ ; CM-TR:  $3,6 \pm 0,7$ ; CA-SED:  $3,3 \pm 0,6$ ; CA-TR:  $3,2 \pm 0,4$ . + Diferença em relação ao CB. # Diferença em relação ao CM. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 7$  para os dados dopaminérgicos e  $n = 8$  para os dados serotoninérgicos). ANOVA two-way.

Na FIG. 21 estão demonstradas as expressões de RNAm dos receptores dopaminérgicos (*Drd1* e *Drd2*, FIG. 21A), enzima tirosina hidroxilase (*Th*, FIG. 21B) e transportador de DA (*Dat*, FIG. 21C) no CPu. Não foram observadas diferenças na expressão do RNAm do receptor *Drd1* e da *Th*. Já, os valores de RNAm do receptor *Drd2*, nos animais que permaneceram SED, foram maiores no grupo CB em comparação com os grupos CM e CA ( $P < 0,05$ ). Entretanto, a expressão deste gene foi diminuída com o TF nos animais CB ( $P < 0,001$ ; FIG. 21B). As diferenças na expressão do RNAm de *Drd2*, observadas entre os grupos SED em relação à capacidade intrínseca para o EF não foram mais evidenciadas após seis semanas de TF aeróbico. Em resposta ao TF, a expressão de *Dat* também diminuiu no grupo CB (CB-TR > CB-SED;  $P < 0,01$ ; FIG. 21D).



**FIGURA 21 –RNAm de variáveis dopaminérgicas, no CPu, dos grupos CB, CM e CA sedentários e treinados. (A) RNAm de *Drd1***: CB-SED:  $1,6 \pm 0,09$ ; CB-TR:  $1,3 \pm 0,2$ ; CM-SED:  $1,0 \pm 0,09$ ; CM-TR:  $1,1 \pm 0,1$ ; CA-SED:  $1,4 \pm 0,1$ ; CA-TR:  $1,3 \pm 0,1$ . **(B) RNAm de *Drd2***: CB-SED:  $2,0 \pm 0,3$ ; CB-TR:  $1,1 \pm 0,1$ ; CM-SED:  $1,0 \pm 0,1$ ; CM-TR:  $1,1 \pm 0,06$ ; CA-SED:  $1,5 \pm 0,2$ ; CA-TR:  $1,1 \pm 0,1$ . **(C) RNAm de *Th***: CB SED:  $0,7 \pm 0,1$ ; CB-TR:  $1,2 \pm 0,4$ ; CM-SED:  $1,0 \pm 0,2$ ; CM-TR:  $0,9 \pm 0,1$ ; CA-SED:  $0,6 \pm 0,08$ ; CA-TR:  $0,6 \pm 0,08$ . **(D) RNAm de *Dat***: CB-SED:  $1,9 \pm 0,4$ ; CB-TR:  $0,7 \pm 0,1$ ; CM-SED:  $1,3 \pm 0,3$ ; CM-TR:  $0,9 \pm 0,1$ ; CA-SED:  $1,0 \pm 0,2$ ; CA-TR:  $1,2 \pm 0,3$ . + Diferença em relação ao CB. # Diferença em relação ao CM. \* Diferença em relação ao SED. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 7$  para os grupos CB-SED, CB-TR, CM-TR e CA-TR e  $n = 6$  para os grupos CM-SED e CA-SED). ANOVA two-way.

No CPu também foram realizadas as análises do RNAm dos fatores neurotróficos *Gdnf* e *Bdnf*. O TF aeróbico induziu um aumento do RNAm de *Gdnf* no grupo CB ( $P < 0,05$ ; FIG. 22A) e uma diminuição do RNAm de BDNF no grupo CA ( $P < 0,05$ ; FIG 22B).



**FIGURA 22 - RNAm dos fatores neurotróficos, no CPu, dos grupos CB, CM e CA sedentários e treinados. (A) RNAm de *Gdnf*:** CB-SED:  $0,6 \pm 0,08$ ; CB-TR:  $1,5 \pm 0,3$ ; CM-SED:  $0,9 \pm 0,08$ ; CM-TR:  $0,9 \pm 0,1$ ; CA-SED:  $0,7 \pm 0,08$ ; CA-TR:  $1,0 \pm 0,1$ . **(B) RNAm de *Bdnf*:** CB-SED:  $1,8 \pm 1,2$ ; CB-TR:  $2,3 \pm 0,7$ ; CM-SED:  $1,5 \pm 0,8$ ; CM-TR:  $3,8 \pm 1,2$ ; CA-SED:  $3,0 \pm 0,7$ ; CA-TR:  $0,8 \pm 0,2$ . \* Diferença entre as situações: TR e SED. + Diferença em relação ao CB. # Diferença em relação ao CM. \* Diferença em relação ao SED. Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 7$  para os grupos CB-SED, CB-TR, CM-TR e CA-TR e  $n = 6$  para os grupos CM-SED e CA-SED).

## 4 DISCUSSÃO

Em conjunto, os principais resultados deste estudo indicam que a capacidade intrínseca para o EF modula a treinabilidade e a neuroplasticidade induzidas por seis semanas de treinamento físico aeróbico. Com relação às diferenças na capacidade intrínseca para o EF, encontramos, como esperado, diferenças inatas no desempenho. Ao compararmos os três grupos experimentais (CB, CM e CA), considerando o TE dos animais CM como referência (100%), observamos que o desempenho no teste de esforço progressivo dos grupos CB e CA foram, respectivamente, 27% e 141%. De fato, trabalhos prévios têm demonstrado existir essa variabilidade inata no desempenho de animais (ratos e camundongos) inter-linhagem (MASSET e BERK, 2005; LERMAN *et al.*, 2002), intra-linhagem (PRÍMOLA-GOMES *et al.*, 2010; RABELO *et al.*, 2015) ou provenientes de cruzamentos genéticos (KOCH e BRITTON, 2001; MEEK *et al.*, 2009). Tais achados evidenciam a contribuição do componente genético na capacidade de realizar o EF, o que pode influenciar de 20% a 92% no desempenho físico (LIGHTFOOT, 2011; BOUCHARD *et al.*, 1986). Essa variabilidade intrínseca tem sido associada com diversas alterações genéticas em sistemas fisiológicos, sendo encontrado, por exemplo, nos animais com baixa predisposição para o EF, maior ganho de massa corporal (KOCH e BRITTON, 2001) e adiposidade (KOCH *et al.*, 2012), resistência à insulina (KOCH *et al.*, 2012), esteatose hepática (THYFAULT *et al.*, 2009) e disfunção endotelial (WISLOFF *et al.*, 2005). Já nos animais com alta predisposição para o EF, já foi constatado maior longevidade (KARVINEN *et al.*, 2015), maior  $VO_{2max}$  (BRITTON e KOCH, 2005), maior expressão de proteínas relacionadas a

biogênese mitocondrial (BRITTON e KOCH, 2005), maior capacidade oxidativa (WISLOFF *et al.*, 2005), dentre outras.

Além das diferenças inatas no desempenho, encontramos que o  $VO_{2max}$  e a eficiência mecânica (EM) diferiram entre os três grupos experimentais (CB < CM < CA). Em relação ao consumo de oxigênio, nossos resultados reforçam os dados observados na 15ª geração dos animais HCR e LCR em que foi verificada diferenças intrínsecas no  $VO_{2max}$  entre essas castas de animais [LCR: 46 e HCR: 69 mL $O_2$ /kg.min (GONZALEZ *et al.*, 2006)]. Nos animais HCR e LCR, tais diferenças foram decorrentes, principalmente, de alterações na extração de  $O_2$ . Nos animais HCR foi encontrado maior densidade capilar nos músculos, o que resultou em aumento na capacidade de captação de  $O_2$  tecidual (GONZALEZ *et al.*, 2006; HUSSAIN *et al.*, 2001). No entanto, nossos achados não nos permitiram inferir quais as respostas fisiológicas poderiam ser responsáveis por gerar diferenças no  $VO_{2max}$  entre os grupos experimentais. Assim, considerando que o  $VO_{2max}$  é limitado pela capacidade do sistema cardiorrespiratório e pela difusão de oxigênio tecidual (LEVINE, 2008), serão necessários futuros estudos para investigar quais desses fatores são distintos entre os animais CB, CM e CA. Em relação aos valores absolutos de  $VO_{2max}$  em cada grupo, nossos dados são coerentes com os resultados encontrados em ratos *Okomato-Aoki* e *Wistar-Kyoto* e nas castas HCR e LCR submetidos a um protocolo progressivo (BEDFORD *et al.*, 1979; BROOKS e WHITE, 1978; GONZALEZ *et al.*, 2006). No entanto, em outras linhagens de ratos, como *Sprague-Dawley*, valores de até 90 mL $O_2$ /kg.min já foram observados (BEDFORD *et al.*, 1979; SHEPHERD e GOLLNICK, 1976).

Somando-se às diferenças encontradas no  $VO_{2max}$ , os animais diferiram na EM durante o teste progressivo. No início do EF (12 min), quando os três grupos estavam correndo, a EM foi inferior nos animais CB. Já aos 33 min, a EM foi maior no grupo CA em relação ao CM. Na fadiga, a EM diferiu entre os três grupos experimentais. Considerando a variabilidade intrínseca no desempenho físico entre os grupos, era plausível que os animais apresentassem divergências na eficiência de corrida. Em estudo prévio observamos que os animais CA apresentam, no basal, maior atividade dopaminérgica no CPu (área relacionada com o controle motor) (RABELO *et al.*, 2015). Este pode ser um dos fatores responsáveis por gerar no grupo CA, um melhor controle do movimento, e conseqüentemente, melhor EM. De fato, Balthazar e colaboradores (2010) encontraram que a administração *i.c.v.* de DA atenua a queda da EM observada durante um teste progressivo (atenuação de 40% em relação ao grupo controle).

No presente estudo, também foi observado que, no decorrer do teste progressivo, a EM aumentou até o momento da fadiga. Isso pode ter sido decorrente do protocolo utilizado para a determinação do desempenho máximo que apresentava uma velocidade inicial baixa (10 m/min) com aumentos pequenos na velocidade (1 m/min) a cada 3 min. Assim, é possível que as velocidades iniciais adotadas no protocolo tenham sido biomecanicamente desfavoráveis para o desempenho do animal. Em pesquisa prévia já foi constatado que ratos submetidos a um protocolo máximo em esteira pode alcançar velocidade de até 60 m/min (SHEPHERD e GOLLNICK, 1976). Em relação ao padrão de marcha dos ratos durante os testes progressivos realizados nesta pesquisa, notamos que nos primeiros estágios do protocolo o animal

caminhou e deslizou pela esteira. Apenas nos estágios subsequentes que ele começou a trotar e a correr. Farley e colaboradores (1993) discutem que diferentes mamíferos, inclusive ratos, ao correrem em velocidades mais elevadas, diminuem o tempo de contato com o solo o que diminui o tempo de transição entre a fase excêntrica e concêntrica de ação dos músculos envolvidos. Isso favorece a utilização do ciclo de alongamento-encurtamento (CAE) devido a energia elástica armazenada nos tendões, o que conseqüentemente pode interferir na EM (FARLEY *et al.*, 1993).

Além das diferenças inatas no desempenho físico dos animais estudados, verificamos que a capacidade intrínseca também modulou a resposta destes animais ao treinamento físico aeróbico (treinabilidade). No grupo CB, seis semanas de EF aeróbico de intensidade moderada foi suficiente para elevar em 600% o desempenho físico dos animais. Já nos grupos CM e CA, observamos um aumento relativo no TE de aproximadamente 31% e 51%, respectivamente. Além disso, encontramos uma correlação inversa e moderada entre o desempenho físico inicial e o delta de desempenho em todos os grupos experimentais, o que é condizente com o *princípio do valor inicial*. Este estabelece que organismos com menores valores iniciais de desempenho físico são os que apresentam maior capacidade de melhora com o TF (KOCH *et al.*, 2005; KOHRT *et al.*, 1991). Essa relação entre desempenho físico inicial e treinabilidade tem sido investigada em outros trabalhos experimentais (HOYDAL *et al.*, 2007; KOCH *et al.*, 2005; MASSET *et al.*, 2005). No entanto, na maioria dos estudos são observados resultados opostos ao que é estabelecido pelo *princípio*. Por exemplo, no estudo de Koch e colaboradores (2005), duas

linhagens de ratos com diferenças intrínsecas no desempenho [linhagem *Dark Agouti* (DA): alto-desempenho, linhagem *Copenhagen* (COP): baixo-desempenho] foram submetidas a dois protocolos de TF (80% do desempenho físico por oito semanas, cinco vezes por semana ou treinamento inicial de 10 m/min, 20 min com aumentos diários de 0,5 min na duração e 1 m/min na velocidade de treino). Em ambas as situações o grupo *Darki Agouti* apresentou maior treinabilidade quando comparado aos animais *Copenhagen*. Resposta semelhante foi observada no trabalho de Masset e Berk (2005) ao submeter três linhagens de camundongos com diferenças iniciais no desempenho (desempenho das linhagens: FVB > Balb/c > BL6) ao treinamento físico por quatro semanas. O grupo que apresentou maior treinabilidade foi FVB, que manifestava maiores valores de TE iniciais. No estudo de Hoydal e colaboradores (2007), camundongos com alto desempenho na roda (HR) e camundongos do grupo controle (C) realizaram dois protocolos de treinamento físico (intervalado de alta intensidade e moderado de intensidade constante). Como resultados, os autores encontraram maiores ganhos de  $VO_{2max}$  nos animais HR (HOYDAL *et al.*, 2007). Nossos achados contradizem os dados de Hoydal e colaboradores (2007), Koch e colaboradores (2005) e Masset e Berk (2005). Tais diferenças podem ser justificadas pelas manipulações nos componentes da carga de treinamento que foram distintas entre todos os experimentos. No presente trabalho, tanto a duração quanto a intensidade foram relativizadas pelo desempenho inicial de cada grupo, o que pode ter resultado em um protocolo de treinamento físico mais adequado para a capacidade de cada grupo experimental. Neste caso, acreditamos que o TF possa ter compensado a predisposição genética para o baixo desempenho físico,

desencadeando as adaptações centrais e periféricas observadas nos animais de baixa capacidade intrínseca para o exercício.

Os animais com baixo desempenho foram os que tiveram menor duração da sessão de treino (20 para 29 min; no decorrer das 6 semanas) e velocidades absolutas de treino (1ª a 3ª sem: 10 m/min; 3ª a 6ª sem: 14 m/min) quando comparados aos demais grupos experimentais (*TE de treino* - CM: 44 para 64 min; CA: 87 para 129 min, no decorrer das 6 semanas; *velocidade de treino* do CM – 1ª a 3ª sem: 13 m/min; 3ª a 6ª sem: 15 m/min; *velocidade de treino* do CA - 1ª a 3ª sem: 18 m/min; 3ª a 6ª sem: 20 m/min). No entanto, esse grupo CB foi o único a apresentar valores mais elevados de  $VO_{2max}$  quando comparado ao respectivo grupo controle SED. Estudos têm demonstrado diferenças no  $VO_{2max}$  em grupos de animais treinados quando comparados ao seu controle (SED), porém com protocolos de treino mais intensos [(duração: 60 min; velocidades: de 15 a 27 m/min) BEDFORD *et al.*, 1979; (duração: 8 min; 85 – 90% do  $VO_{2max}$ , com pausa ativa de 2 min a 60% do  $VO_{2max}$ ) HOYDAL *et al.*, 2007]. Diante disso, como o grupo CB mostrou um aumento de 600% no desempenho, além de maior  $VO_{2max}$ , quando comparado ao grupo SED, ao ser submetido a um treinamento de intensidade moderada (40% do  $TE_{max}$  e 60% da  $V_{max}$ ), especulamos que o grupo CB seja mais sensível aos efeitos do treinamento, o que pode ter relação com o seu baixo desempenho inicial. Após o TF, o  $VO_{2max}$  permaneceu elevado no grupo CA quando comparado aos demais, no entanto, a EM não diferiu entre os animais. Não podemos excluir que fatores como aprendizagem do gesto motor, envelhecimento e alterações na massa corporal possam ter interferido na

capacidade de corrida de cada grupo, anulando assim as diferenças entre as capacidades intrínsecas.

Em relação aos parâmetros de massa e composição corporal, nos animais SED, não foram observadas diferenças na MC. No entanto, o IA foi maior nos animais CB em relação aos demais grupos. Estudos têm demonstrado que animais com baixa predisposição para o EF apresentam maior percentual de gordura (STEPHENSON *et al.*, 2013; LESSARD *et al.*, 2011), o que associado com outras alterações (diminuição da capacidade oxidativa, aumento de ácidos graxos não-esterificados, diminuição da resposta endotelial e aumento da massa corporal total) predispõe a doenças metabólicas, tais como: resistência à insulina e dislipidemia (STEPHENSON *et al.*, 2013; GONZALEZ *et al.*, 2006; WISLOFF *et al.*, 2005). No entanto, em resposta ao TF, o grupo CB foi o único a apresentar diminuição da MC e IA, além de aumento da massa magra (músculo sóleo) quando comparado ao seu controle SED. Esses achados demonstram que animais com baixo desempenho inicial para o EF apresentam adaptações benéficas na composição corporal com o treinamento aeróbico. Considerando que o grupo CB foi o que teve menor gasto calórico com o TF, quando comparado aos grupos CM e CA, é possível que alterações na ingestão alimentar no decorrer das seis semanas possam ter contribuído para as alterações na composição corporal apresentadas pelos ratos CB. No grupo CM ocorreu apenas diminuição do IA com o treinamento físico. No entanto, nos animais que tiveram maior gasto calórico com o treinamento (CA) não foram observadas mudanças na composição corporal. Neste grupo, hipotetizamos que o TF aeróbico tenha modulado a ingestão alimentar e/ou digestibilidade

alimentar. De fato, Swallow e colaboradores (2010) observaram que animais HCR com acesso a roda aumentam a ingestão e a digestibilidade do alimento. De acordo com os autores, essas são respostas encontradas em situações de alto gasto energético, tais como: lactação, exposição a altitudes elevadas ou realização de EF intenso.

Os animais com diferenças na capacidade intrínseca para o exercício físico, além de apresentarem alterações periféricas, também exibiram diferenças centrais (SNC). Em trabalho anterior do nosso grupo, mostramos a participação do sistema dopaminérgico no desempenho físico de animais com diferenças intrínsecas para o EF [maior atividade dopaminérgica basal no CPu (RABELO et al., 2015)]. Corroborando estes achados prévios, no presente estudo os animais CA apresentaram menor concentração de DA e maior concentração do metabólito DOPAC no CPu, o que resultou em maior razão DOPAC/DA (indicativo de atividade dopaminérgica). Considerando que a DA no CPu está associada com o controle motor e motivação para a corrida (FOLEY e FLESHNER, 2008; KNAB e LIGHTFOOT, 2010), é possível que no grupo CA a maior atividade dopaminérgica basal seja um dos fatores que tenha contribuído para o alto desempenho nesses animais. De fato, trabalhos anteriores, realizados com ratos e humanos, têm demonstrado que agonistas dopaminérgicos aumentam o desempenho físico (BALTHAZAR *et al.*, 2009; WATSON *et al.*, 2005; BAILEY *et al.*, 2003). Resultado semelhante foi encontrado por Mathes e colaboradores (2010) que observaram aumento basal da atividade dopaminérgica em camundongos selecionados para manifestarem altos níveis de atividade na roda.

Além das divergências na atividade dopaminérgica entre grupos, na presente pesquisa também foi constatado que animais CB apresentam, intrinsecamente, maior expressão de RNAm de *Drd2*. Estudo prévio demonstrou que o aumento do receptor D2 no CPu causa alterações no sistema dopaminérgico, sendo um dos fatores relacionados ao desenvolvimento do Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) (CHO *et al.*, 2014). Isso foi observado em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), usados também como modelo de TDAH. Esses animais possuem aumento do receptor D2 no CPu e SNpc, o que está associado com diminuição da atividade neural no córtex pré-frontal (CHO *et al.*, 2014). No entanto, apesar das evidências nos animais SHR, nossos dados são os primeiros a demonstrar aumento da expressão do RNAm de *Drd2* em animais não manipulados geneticamente e sua relação com o baixo desempenho físico. Baseado nesses achados, torna-se interessante o desenvolvimento de estudos posteriores para investigar se ratos CB apresentam outras alterações neurais presentes no modelo de TDAH, além de respostas comportamentais características do quadro.

Somando-se às alterações observadas no sistema dopaminérgico entre os animais, também foi encontrado que animais CM-SED apresentam maior concentração de 5HIAA, no CPu, quando comparados aos demais grupos experimentais. Esse resultado aponta para possíveis diferenças na neurotransmissão serotoninérgica nos animais CM. No entanto, considerando a complexidade desse sistema monoaminérgico (BERGER *et al.*, 2009), futuras investigações serão necessárias para complementação e discussão desse achado.

Uma de nossas hipóteses no presente estudo era que a capacidade intrínseca para o EF iria influenciar as adaptações centrais induzidas pelo treinamento físico aeróbico. De fato, observamos que os animais com baixa capacidade para o EF (grupo CB), além de apresentarem maior responsividade ao TF em relação as variáveis de desempenho, manifestaram maiores adaptações centrais. Assim, em resposta ao TF, a plasticidade neural foi observada principalmente no grupo CB (aumento da expressão do RNAm de *Gdnf*, diminuição da expressão do RNAm de *Dat*, diminuição da expressão do RNAm de *Drd2* e aumento da razão DOPAC/DA no CPu).

O GDNF é considerado o principal fator neurotrófico relacionado com a sobrevivência, a regeneração e a função do sistema dopaminérgico (SARIOLA e SAARMA, 2003). Inclusive, várias pesquisas têm sido desenvolvidas visando a utilização do GDNF no tratamento da doença de Parkinson (STAUDT *et al.*, 2015; PATEL *et al.*, 2013; LANG *et al.*, 2006; SLEVIN *et al.*, 2005; PATEL *et al.*, 2005; GILL *et al.*, 2003). Comprovando a importância do GDNF na plasticidade dopaminérgica, Sun e colaboradores (2005) demonstraram que, em animais lesionados com 6-OHDA, o aumento de GDNF nas vias dopaminérgicas é mais efetivo para promover neuroregeneração e melhora motora quando comparado ao BDNF. Em pesquisas realizadas com ratos e camundongos, já foi constatado que o EF realizado após danos cerebrais (infarto cerebral ou lesões em vias dopaminérgicas) desencadeia aumento de GDNF (OHWATASHI *et al.*, 2013; LAU *et al.*, 2011; TAJIRI *et al.*, 2010). No entanto, os resultados acerca da relação entre GDNF e EF ainda são escassos na literatura, principalmente em tecidos cerebrais intactos. No presente estudo, observamos que EF aeróbico

realizado por seis semanas, a 60% da  $V_{max}$  e 40% do  $TE_{max}$ , aumenta a expressão do RNAm de *Gdnf*, no CPu, de animais CB. Diante disso, especulamos que as adaptações dopaminérgicas encontradas nos animais CB sejam consequência do aumento da expressão desse fator trófico, uma vez que alterações não foram observadas na expressão do RNAm de *Bdnf*.

No grupo CB-TR, a diminuição do RNAm de *Dat* pode ter possibilitado o aumento da atividade dopaminérgica devido a diminuição da recapitação de DA para o neurônio pré-sináptico. O DAT tem um papel chave na neurotransmissão dopaminérgica, o que fica evidente quando analisado o efeito desencadeado por drogas de abuso como cocaína e anfetamina que se liga ao DAT, diminuindo assim a recapitação de DA (ESPAÑA e JONES, 2014; CRAGG e RICE, 2004). Em acordo com nossa hipótese, Petzinger e colaboradores (2010) observaram que o EF por quatro semanas diminuiu a expressão do RNAm de *Dat* e da proteína DAT em camundongos lesionados com MPTP, aumentou a liberação de DA e diminuiu a taxa de decaimento dessa liberação após estimulação por voltametria. Diante de tais evidências, argumentamos que no grupo CB-TR, a diminuição de DAT possa ter desencadeado aumento da disponibilidade de DA na fenda sináptica, o que pode ter possibilitado o aumento do *turnover* dopaminérgico (razão DOPAC/DA). Considerando o envolvimento da DA estriatal no controle motor e motivação para o EF (KNAB e LIGHTFOOT, 2010), é possível que o aumento da razão DOPAC/DA tenha sido um dos fatores que contribuiu para o expressivo ganho de desempenho observado nos animais CB em resposta ao treinamento aeróbico.

O aumento da atividade dopaminérgica desencadeada pela redução da expressão do RNAm de *Dat* pode ter resultado na diminuição da expressão de RNAm do receptor *Drd2*. De fato, Fauchey e colaboradores (2000) observaram que camundongos nocautes para DAT (modelo  $DAT^{-/-}$ ) possuem hiperdopaminergia, o que gera diminuição de 36% na expressão do RNAm de *Drd2* no CPu. Como resultado dessas alterações dopaminérgicas, os animais  $DAT^{-/-}$  apresentam aumento da atividade locomotora (GIROS *et al.*, 1996). A diminuição dos receptores D2 no CPu também já foi observada nos animais SHR (modelo de TDAH) evidenciando que o EF pode ser uma estratégia não-farmacológica para complementar o tratamento de TDAH (CHO *et al.*, 2014). Entretanto, apesar de evidências semelhantes as do presente estudo já terem sido observadas nos modelos  $DAT^{-/-}$  e TDAH, pela primeira vez mostramos a influência da capacidade intrínseca para o EF na neuroplasticidade dopaminérgica induzida pelo TF aeróbico.

Por outro lado, no grupo CA, o TF diminuiu a expressão do RNAm de *Bdnf*. Em todos os grupos, os animais treinaram com intensidade de 60% da  $V_{max}$  para que o TF não desencadeasse aumentos exacerbados na resposta de corticosterona, o que poderia inibir a liberação de BDNF (HEIJNEN *et al.*, 2015; ROTHAMAN e MATTSON, 2013; KASHIHARA *et al.*, 2009). Já em relação a duração, todos os ratos correram durante 40% do tempo de EF obtido a 60% da  $V_{max}$ . No entanto, considerando as discrepâncias iniciais no desempenho físico entre os animais, em termos absolutos, os grupos treinaram com valores de velocidades e durações distintas. As combinações desses fatores fizeram com que a distância percorrida (o que representaria o volume de treinamento) por cada grupo fosse

diferente, sendo maior nos animais CA (FIG.15). Não podemos, portanto, excluir a possibilidade de que o protocolo de TF possa ter exacerbado a produção de corticosterona nesse grupo. De acordo com Rothman e Mattson, (2013) existe uma relação de U invertido entre BDNF e corticosterona. Estímulos estressores leves (EF de intensidade moderada, restrição alimentar moderada, demanda cognitiva) aumentam a produção de BDNF. Por outro lado, EF intenso, estresse de contenção, exposição ao predador são agentes estressores que induzem a produção exacerbada de corticosterona, que por sua vez, inibe a transcrição e sinalização de BDNF no SNC (ROTHMAN e MATTSON, 2013; LU, 2003). Além disso, no grupo CA, somando-se a maior distância de corrida realizada no decorrer das seis semanas, a velocidade adotada pode ter sido superior a velocidade no limiar de lactato, o que também poderia influenciar na magnitude da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, exacerbando a produção de corticosterona. De fato, Soya e colaboradores (2011; 2007) têm demonstrado em ratos *Wistar* que a corrida realizada acima do limiar de lactato induz a ativação do núcleo paraventricular no hipotálamo, o que resulta em aumento da concentração do hormônio adrenocorticotrófico e consequente liberação de corticosterona. Complementando nossa argumentação, no presente estudo adotamos o modelo de EF forçado (na esteira), o que pode ter contribuído para aumentar o estresse no grupo CA (que permanecia por mais tempo “fugindo” de um estímulo aversivo - choque). De fato, várias evidências presentes na literatura demonstram que protocolos de EF voluntários (acesso a roda) (KE *et al.*, 2011; GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2002; BERCHTOLD *et al.*, 2005; VAYNMAN *et al.*, 2005; OLIFF *et al.*, 1998; NEEPER *et al.*, 1996), EF acrobático (KLINTSOVA *et al.*, 2004) e EF forçado com durações inferiores a 60 min e velocidade inferior a 15

m/min (SMITH *et al.*, 2011; TAJIRI *et al.*, 2010; PETZINGER *et al.*, 2007) aumentam a expressão do RNAm de *Bdnf* e a proteína BDNF em diferentes áreas do SNC. Assim, hipotetizamos que no grupo CA o estresse desencadeado pelo TF (sessões de EF forçado, 5x/semana, com duração de 87 a 129 min e velocidade superiores a 18 m/min) possa ter aumentado a concentração de corticosterona diminuindo a expressão de RNAm de *Bdnf* no CPu. Como consequência, essa diminuição da expressão do RNAm de *Bdnf* pode ter ocasionado a atenuação da atividade dopaminérgica observada nesse grupo.

#### **4.1 Conclusão**

Os dados do presente estudo confirmam o princípio do valor inicial relacionado à treinabilidade e indicam que a capacidade intrínseca para o EF influencia na neuroplasticidade dopaminérgica induzida pelo treinamento físico. Esses resultados representam importantes achados para o entendimento da relação entre capacidade genética e atividade dopaminérgica.

## REFERÊNCIAS

ACWORTH, I. *et al.* Effect os sustained exercise on concentrations of plasma aromatic and branched-chain amino acids and brain amines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 137, n. 1, p. 149-152, 1986.

AHLENIUS, S. *et al.* Biphasic effects of 8-OH-DPAT on endurance of treadmill performance in the male rat. **Eur Neuropsychopharmacol.**, n. 7, p. 89-94, 1997.

AKIYAMA, K.; SUTOO, D. Rectifying effect of exercise on hypertension in spontaneously hypertensive rats via a calcium-dependent dopamine synthesizing system in the brain. **Brain research**, v. 823, n. 1, p. 154-160, 1999.

BAILEY, S.P. *et al.* Neuroendocrine and substrate responses to altered brain 5-HT activity during prolonged exercise to fatigue. **Journal of Applied Physiology**, v. 74, n. 6, p. 3006-3012, 1993.

BALTHAZAR, C. H. *et al.* Effects of blockade of central dopamine D1 and D2 receptor on thermoregulation, metabolic rate and running performance. **Pharmacological Reports**, v. 62, p. 54-61, 2010.

BALTHAZAR, C.H. *et al.* Performance-enhancing and thermoregulatory effects of intracerebroventricular dopamine in running rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 93, n. 4, p. 465-469, 2009.

BEDFORD, T.G. *et al.* Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. **Journal of Applied Physiology**, v. 47, n. 6, p. 1278-1283, 1979.

BEN-JONATHAN, N.; HNASKO, R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 6, p. 724-763, 2001.

BERCHTOLD *et al.* Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 133, n. 3, p. 853-861, 2005.

BERGER, M.G. *et al.* The expanded biology of serotonin. **Annu. Rev. Med.** 60, 355-366, 2009.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1156-1166, 2012.

BLESA *et al.* Classic and new animal models of Parkinson's disease. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

BOUCHARD, C. *et al.* Aerobic performance in brothers, dizygotic and monozygotic twins. **Med Sci Sports Exerc**, v. 18, n. 6, p. 639-46, 1986.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 72, 248-54, 1976.

BRITTON, S.L.; KOCH, L.G. Animal models of complex diseases: an initial strategy. **IUBMB life**, v. 57, n. 9, p. 631-638, 2005.

BROOKS, G.A.; WHITE, T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **Journal of applied physiology**, v. 45, n. 6, p. 1009-1015, 1978.

BROOKS, G.A; WHITE, T.P. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 45, n. 6, p. 1009-1015, 1978.

CARNICELLA, S.; RON, D.. GDNF-a potential target to treat addiction. **Pharmacology & therapeutics**, v. 122, n. 1, p. 9-18, 2009.

CASSILHAS *et al.* Physical exercise, neuroplasticity, spatial learning and memory. **Cellular and molecular life sciences**, v. 73, n. 5, p. 975-983, 2016.

CECHETTI *et al.* Effect of a neuroprotective exercise protocol on oxidative state and BDNF levels in the rat hippocampus. **Brain research**, v. 1188, p. 182-188, 2008.

CHAOULOFF, F. *et al.* Amphetamine and  $\alpha$ -methyl-p-tyrosine affect the exercise-induced imbalance between the availability of tryptophan and synthesis of serotonin in the brain of the rat. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 8, p. 1099-1106, 1987.

CHO, H.S. *et al.* Effect of exercise on hyperactivity, impulsivity and dopamine D2 receptor expression in the substantia nigra and striatum of spontaneous hypertensive rats. **J Exerc Nutrition Biochem.** 18, 379-84, 2014.

COIMBRA, C.C. *et al.* The involvement of brain monoamines in the onset of hyperthermic central fatigue. **An International Perspective on Topics in Sports Medicine and Sport Injury**, p. 275-295, Kenneth R. Zaslav (Editor), ISBN: 978-953-51-0005- 8, InTech, In: <http://www.intechopen.com/books>, 534 paginas, 2010.

COOPER, J.R.B. *et al.* The Biochemical Basis of Neuropharmacology. **Oxford University Press**, 1991.

CORDEIRO, L. M. S. *et al.* Inhibition of tryptophan hydroxylase abolishes fatigue induced by central tryptophan in exercising rats. **Scandinavian Journal of in Medicine and Science in Sports**, v. 24, n. 1, p. 80-88, 2012.

COTMAN *et al.* Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 9, p. 464-472, 2007.

COWANSAGE *et al.* Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. **Current molecular pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 12, 2010.

CRAGG, S.J.; RICE, M.E. DANCING past the DAT at a DA synapse. **Trends in neurosciences**, v. 27, n. 5, p. 270-277, 2004.

DAVIS, J.M.; BAILEY, S.P. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 29, n. 1, p. 45-47, 1997.

DEY, S., *et al.* Exercise training: significance of regional alterations in serotonin metabolism of rat brain in relation to antidepressant effect of exercise. **Physiol Behav.** 52, 1095-9, 1992.

DROSTE, S.K. *et al.* Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocrinology**, v. 144, n. 7, p. 3012-3023, 2003.

DUTRA *et al.* Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. **Neurological Sciences**, v. 33, n. 5, p. 1137-1144, 2012.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1357-1391, 2011.

DWYER, D.; BROWNING, J. Endurance training in wistar rats decreases receptor sensitivity to a serotonin agonist. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 170, n. 3, p. 211-216, 2000.

ESPAÑA, R.A.; JONES, S.R. Presynaptic dopamine modulation by stimulant self administration. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 5, p. 261, 2013.

FARLEY, C.T. *et al.* Thomas A. Running springs: speed and animal size. **Journal of experimental Biology**, v. 185, n. 1, p. 71-86, 1993.

FAUCHEY, V. *et al.* Dopamine control of striatal gene expression during development: relevance to knockout mice for the dopamine transporter. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 9, p. 3415-3425, 2000.

FERREIRA *et al.* Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain. **Brain research**, v. 1361, p. 31-42, 2010.

FISHER, B. E. *et al.* 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, p. 378-390, 2004.

FOLEY *et al.* Brain Activation Patterns at Exhaustion in Rats That Differ in Inherent Exercise Capacity. **PloS one**, v. 7, n. 9, 2012.

FOLEY, T.E., *et al.* Elevated central monoamine receptor mRNA in rats bred for high endurance capacity: implications for central fatigue. **Behav Brain Res.**, p. 174, 132-42, 2006.

FOLEY, T.E.; FLESHNER, M. Neuroplasticity of dopamine circuits after exercise: implications for central fatigue. **Neuromolecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 67-80, 2008.

FREED, C. R.; YAMAMOTO, B. K. Regional brain dopamine metabolism: a marker for the speed, direction, and posture of moving animals. **Science**, v. 229, n. 4708, p. 62-65, 1985.

FUCHS, E.; FLÜGGE, G.. Adult neuroplasticity: more than 40 years of research. **Neural Plasticity**, v. 2014, 2014.

GARCIA, P. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. **Brain Research**, v. 1456, p. 36-48, 2012.

GERALD, M. C. Effects of (+)-amphetamine on the treadmill endurance performance of rats. **Neuropharmacology**, v. 17, n. 9, p. 703-704, 1978.

GILL, S.S. *et al.* Direct brain infusion of glial cell line–derived neurotrophic factor in Parkinson disease. **Nature medicine**, v. 9, n. 5, p. 589-595, 2003.

GIROS, B. *et al.* Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. **Nature**, v. 379, n. 6566, p. 606, 1996.

GOMES DA SILVA, S.; ARIDA, R. M. Physical activity and brain development. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 15, n. 9, p. 1041-1051, 2015.

GÓMEZ-PINILLA, F. *et al.* Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **Journal of neurophysiology**, v. 88, n. 5, p. 2187-2195, 2002.

GONZALEZ, N.C. *et al.* Continued divergence in  $\dot{V}O_2$  max of rats artificially selected for running endurance is mediated by greater convective blood O<sub>2</sub> delivery. **Journal of Applied Physiology**, v. 101, n. 5, p. 1288-1296, 2006.

GORTON *et al.* Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 213, n. 2, p. 253-262, 2010.

GREENWOOD *et al.* Wheel running alters serotonin (5-HT) transporter, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and alpha<sub>1b</sub>-adrenergic receptor mRNA in the rat raphe nuclei. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 5, p. 559-568, 2005.

GROVES-CHAPMAN, Jessica L. *et al.* Changes in mRNA levels for brain-derived neurotrophic factor after wheel running in rats selectively bred for high-and low-aerobic capacity. **Brain research**, v. 1425, p. 90-97, 2011.

GRUBBS, F.E.. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. **Technometrics**, 1969.

HASEGAWA, H., *et al.* Influence of brain catecholamines on the development of fatigue in exercising rats in the heat. **J Physiol**. 586, p. 141-9, 2008.

HEIJNEN, S. *et al.* Neuromodulation of Aerobic Exercise—A Review. **Frontiers in psychology**, v. 6, p. 1890, 2016.

HEIJNEN, S., *et al.* Neuromodulation of Aerobic Exercise-A Review. **Front Psychol.**, 1890, 2015.

HENDERSON, K.K. *et al.* Determinants of maximal O<sub>2</sub> uptake in rats selectively bred for endurance running capacity. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 4, p. 1265-1274, 2002.

HEYES, M. P.; GARNETT, E. S.; COATES, G. Central dopaminergic activity influences rats ability to exercise. **Life Sciences**, v. 36, n. 7, p. 671-677, 1985.

HEYES, M. P.; GARNETT, E. S.; COATES, G. Nigrostriatal dopaminergic activity is increased during exhaustive exercise stress in rats. **Life Sciences**, v. 42, n. 16, p. 1537-1542, 1988.

HIGA-TANIGUCHI *et al.* Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor) adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 4, p. R1717-R1727, 2007.

HOWE *et al.* Prolonged dopamine signalling in striatum signals proximity and value of distant rewards. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 575-579, 2013.

HOWLETT, R.A. *et al.* Selected contribution: skeletal muscle capillarity and enzyme activity in rats selectively bred for running endurance. **Journal Applied Physiology**, v. 94, n. 4, p.1682-1688, 2002.

HØYDAL, M. A. *et al.* Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 14, n. 6, p. 753-760, 2007.

HUANG, A. M. *et al.* Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. **Journal of neural transmission**, v. 113, n. 7, p. 803-811, 2006.

HUSSAIN, S. O. *et al.* Cardiac function in rats selectively bred for low- and high-capacity running. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative Comparative Physiology**, v.281, n. 6, p. R1787-R1791, 2001.

JIA *et al.* Exercise training attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating neurotransmitters and cytokines in hypothalamic paraventricular nucleus. **PloS one**, v. 9, n. 1, 2014.

KARVINEN, S. *et al.* Physical activity in adulthood: genes and mortality. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

KASHIHARA *et al.* Positive effects of acute and moderate physical exercise on cognitive function. **Journal of Physiological Anthropology**, v. 28, n. 4, p. 155-164, 2009.

KE, Z. *et al.* The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e16643, 2011.

KLINTSOVA, A.Y. *et al.* Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise. **Brain research**, v. 1028, n. 1, p. 92-104, 2004.

KNAB, A.M; LIGHTFOOT, J.T. Does the difference between physically active and couch potato lie in the dopamine systems? **International Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 2, p. 133-150, 2010.

KOCH *et al.* Test of the principle of initial value in rat genetic models of exercise capacity. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2, p. R466-R472, 2005.

KOCH, L. G.; BRITTON, S. L. Artificial selection of intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. **Physiological Genomics**, v. 5, n. 1, p. 45-52, 2001.

KOCH, L.G. *et al.* A rat model system to study complex disease risks, fitness, aging, and longevity. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 22, n. 2, p. 29-34, 2012.

KOCH, L.G. *et al.* Test of the principle of initial value in rat genetic models of exercise capacity. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2, p. R466-R472, 2005.

KOCH, L.G.; BRITTON, S.L. Aerobic metabolism underlies complexity and capacity. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 1, p. 83-95, 2008.

KOVRT, W.M. *et al.* Effects of gender, age, and fitness level on response of VO<sub>2</sub>max to training in 60-71 yr olds. **Journal of applied physiology**, v. 71, n. 5, p. 2004-2011, 1991.

KRAVITZ, A.V.; KREITZER, A.C. Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. **Physiology**, v. 27, p. 167-177, 2012.

LACERDA, D.R. *et al.* Osteopetrosis in obese female rats is site-specifically inhibited by physical training. **Experimental physiology**, v. 100, n. 1, p. 44-56, 2015.

LAMBERT, E.V. *et al.* Complex systems model of fatigue: integrative homeostatic control of peripheral physiological systems during exercise in humans. **Br J Sports Med.** 39, 52-62, 2005.

LANG, A.E. *et al.* Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line–derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. **Annals of neurology**, v. 59, n. 3, p. 459-466, 2006.

LAU, Y. *et al.* Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 7, p. 1264-1274, 2011.

LEASURE, J.L.; JONES, M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. **Neuroscience**, v. 156, n. 3, p. 456-465, 2008.

LERMAN, I. *et al.* Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. **Journal Applied Physiology**, v. 92, n. 6, p. 2245-2255, 2002.

LESSARD, S.J. *et al.* Exercise training reverses impaired skeletal muscle metabolism induced by artificial selection for low aerobic capacity. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 1, p. R175-R182, 2011.

LEVINE, Benjamin D. : what do we know, and what do we still need to know?. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 1, p. 25-34, 2008.

LIGHTFOOT, J.T. *et al.* Strain screen and haplotype association mapping of wheel running in inbred mouse strains. **Journal Applied Physiology**, v. 109, n. 3, p. 623-634, 2010.

LIN, T.W., KUO, Y.M.,. Exercise benefits brain function: the monoamine connection. **Brain Sci**, 39-53, 2013.

LLEDO, P.M. *et al.* Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 3, p. 179-193, 2006.

LOOKINGLAND, K.J. *et al.* The metabolism of dopamine in the median eminence reflects the activity of tuberoinfundibular neurons. **Brain Research**.419, 303–310, 1987.

LOU, S. *et al.* Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats. **Brain Research**, v. 1210, p. 48-55, 2008.

LU, B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. **Learning & Memory**, v. 10, n. 2, p. 86-98, 2003.

MARAIS, L. *et al.* Exercise increases BDNF levels in the striatum and decreases depressive-like behavior in chronically stressed rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 24, n. 4, p. 587-597, 2009.

MARQUES, E. *et al.* Influence of chronic exercise on the amphetamine-induced dopamine release and neurodegeneration in the striatum of the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1139, p. 222 - 231, 2008.

MASSET, M.P.; BERK, B.C. Strain-dependent differences in responses to exercise training in inbred and hybrid mice. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v. 288, n. 4, p. R1006-R1013, 2005.

MATHES, W.F. *et al.* Dopaminergic dysregulation in mice selectively bred for excessive exercise or obesity. **Behav Brain Res**. 210, 155-63, 2010.

MCARDLE *et al.* Fisiologia do Exercício. Energia, nutrição e desempenho humano, 5a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1113 pagina, 2003.

MEEK, T.H. *et al.* Endurance capacity of mice selectively bred for high voluntary wheel running. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 18, p. 2908-2917, 2009.

MEEUSEN, R. *et al.* Endurance training effects on neurotransmitter release in rat striatum: an in vivo microdialysis study. **Acta physiologica scandinavica**, v. 159, n. 4, p. 335-341, 1997.

MEEUSEN, R., ROELANDS, B., Central fatigue and neurotransmitters, can thermoregulation be manipulated? **Scand J Med Sci Sports**. 20 Suppl 3, 19-28, 2010.

MITCHELL, A.C. Neuroprotection by physical activity. **Candidate Reviews**, v. 2, p. 76-81, 2010.

MONROE, D.C. *et al.* Striatal enkephalinergic differences in rats selectively bred for intrinsic running capacity. **Brain Research**, v. 1572, p. 11-17, 2014.

NEEPER, S.A. *et al.* Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain research**, v. 726, n. 1, p. 49-56, 1996.

NEWSHOLME, E. A.; BLOMSTRAND, E.; EKBLUM, B.; Physical and mental fatigue: metabolic mechanisms and importance of plasma amino acids. **British Medical Bulletin**, v. 48, n. 3, p. 477-495, 1992.

O'CALLAGHAN *et al.* Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. **Hippocampus**, v. 19, n. 10, p. 1019-1029, 2009.

OHWATASHI, A. *et al.* Exercise enhanced functional recovery and expression of GDNF after photochemically induced cerebral infarction in the rat. 2013.

OLIFF, H.S. *et al.* Exercise-induced regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) transcripts in the rat hippocampus. **Molecular Brain Research**, v. 61, n. 1, p. 147-153, 1998.

PATEL, N.K. *et al.* Benefits of putaminal GDNF infusion in Parkinson disease are maintained after GDNF cessation. **Neurology**, v. 81, n. 13, p. 1176-1178, 2013.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 4<sup>a</sup> edição. **Academic Press**, 456 páginas, 1998.

PETZINGER *et al.* Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse of basal ganglia injury. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 20, p. 5291-5300, 2007.

PETZINGER *et al.* Exercise-enhanced neuroplasticity targeting motor and cognitive circuitry in Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 7, p. 716-726, 2013.

PRÍMOLA-GOMES *et al.* Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. **Journal Applied Physiology**, v. 107, p. 593-598, 2009.

RABELO *et al.* Intrinsic exercise capacity is related to differential monoaminergic activity in the rat forebrain. **Brain Research Bulletin**, v. 112, p. 7-13, 2015.

RANGEL-BARAJAS, C. *et al.* Dopamine receptors and neurodegeneration. **Aging and disease**, v. 6, n. 5, p. 349, 2015.

RODRIGUES, A.G., *et al.* Heat loss during exercise is related to serotonin activity in the preoptic area. **Neuroreport.**, p. 804-8, 2009

RODRIGUES, L.O.C.; SILAMI-GARCIA, E. Fadiga: falha ou mecanismo de proteção? **Temas atuais em educação física**, v. 4; p. 36-48, 1998.

ROMANOVSKY, A.A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of thermoregulatory system. **American Journal of Physiology**, v. 292, n. 1, p. R37-R46, 2007.

ROMANOWSKI, W.; GRABIEC; S. The role of serotonin in the mechanism of central fatigue. **Acta Physiologica Polonica**, v. 25, n. 2, p. 127-134, 1974.

ROTHMAN, S.M.; MATTSON, M.P. Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan. **Neuroscience**, v. 239, p. 228-240, 2013.

RUSSO *et al.* Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 73-82, 2009.

SAGVOLDEN, T. Behavioral validation of the spontaneously hypertensive rat (SHR) as an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder (AD/HD). **Neurosci Biobehav Rev.** 24, 31-9, 2000.

SAGVOLDEN, T., *et al.* Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biol Psychiatry.** 57, 1239-47. 2005.

SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. 3ª edição. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007.

SARIOLA, H.; SAARMA, M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. **J Cell Sci**, v. 116, n. 19, p. 3855-3862, 2003.

SEALFON, S.C.; OLANOW, C.W. Dopamine receptors: from structure to behavior. **Trends in Neurosciences**, v. 23, p. S34-S40, 2000.

SEIFERT *et al.* Endurance training enhances BDNF release from the human brain. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, n. 2, p. R372-R377, 2010.

SHANNON, N.J. *et al.* A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. **J. Neurochem.** 47, 958–965, 1986.

SHEPHERD, R.E.; GOLLNICK, P.D. Oxygen uptake of rats at different work intensities. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 362, n. 3, p. 219-222, 1976.

SLEVIN, J.T. *et al.* Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputaminial infusion of glial cell line—derived neurotrophic factor. **Journal of neurosurgery**, v. 102, n. 2, p. 216-222, 2005.

SMITH *et al.* Effects of treadmill exercise on behavioral recovery and neural changes in the substantia nigra and striatum of the 1-MPTP. **Brain Research**, v. 1386, p. 70-80, 2011.

SOARES, D.D. *et al.* Evidence that tryptophan reduces mechanical efficiency and running performance in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 74, n. 2, p. 357-362, 2003.

SOARES, D.D. *et al.* Intracerebroventricular tryptophan increases heating and heat storage rate in exercising rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 78, n. 2, p. 255-261, 2004.

SOARES, D.D. *et al.* Tryptophan-induced central fatigue in exercising rats is related to serotonin content in preoptic area. **Neuroscience Letters**, v. 415, n. 3, p. 274-278, 2007.

SOYA *et al.* Brain activation via exercise: exercise conditions leading to neuronal activation and hippocampal neurogenesis. **Journal Exercise Nutrition Biochemistry**, v. 15, p. 1-10, 2011.

SOYA, H. *et al.* BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, p. 961–967, 2007.

SOYA, H. *et al.* Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. **Neuroscience Research**, v. 58, n.4, p. 341-348, 2007.

ST CLAIR GIBSON; NOAKES, T.D. Evidence for complex system integration and dynamic neural regulation of skeletal muscle recruitment during exercise in humans. **British Journal Sports Medicine**, v. 38, n. 6, p. 797-806, 2004.

STAHL *et al.* Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1378, p. 105-118, 2011.

STAUDT, M.D. *et al.* Advances in Neurotrophic Factor and Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease: A Mini-Review. **Gerontology**, v. 62, n. 3, p. 371-380, 2015.

STEPHENSON *et al.* Exercise training enhances white adipose tissue metabolism in rats selectively bred for low-or high-endurance running capacity. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 3, p. E429-E438, 2013.

SUN, M. *et al.* Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. **Brain research**, v. 1052, n. 2, p. 119-129, 2005.

SWALLOW, J.G. *et al.* Phenotypic and evolutionary plasticity of body composition in rats selectively bred for high endurance capacity. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 3, p. 778-785, 2010.

SWALLOW, J.G. *et al.* Phenotypic and evolutionary plasticity of body composition in rats selectively bred for high endurance capacity. **Journal of Applied Physiology**, v. 109, n. 3, p. 778-785, 2010.

SZAWKA, R.E., *et al.* Kisspeptin regulates prolactin release through hypothalamic dopaminergic neurons. **Endocrinology**. 151, 3247-57, 2010.

TAJIRI *et al.* Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. **Brain Research**, v. 1310, n. 15, p. 200-207, 2010.

THOMAS *et al.* The effects of aerobic activity on brain structure. **Frontiers in Psychology**, v. 3, n. 86, p. 1-9; 2012.

THYFAULT, J.P. *et al.* Rats selectively bred for low aerobic capacity have reduced hepatic mitochondrial oxidative capacity and susceptibility to hepatic steatosis and injury. **The Journal of Physiology**, v. 587, p 1805-1816, 2009.

TROXELL *et al.* Selected contribution: variation and heritability for the adaptational response to exercise in genetically heterogeneous rats. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 4, p. 1674-1681, 2003.

TUON *et al.* 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.

VAN PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. **Neuromolecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 128-140, 2008.

VAYNMAN, S.; GOMEZ-PINILLA, F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 19, n. 4, p. 283-295, 2005.

WANNER, S.P. *et al.* Muscarinic cholinceptors in the ventromedial hypothalamic nucleus facilitate tail heat loss during physical exercise. **Brain Research Bulletin**, v. 73, n. 1, p. 28-33, 2007.

WANNER, S.P. *et al.* Physical exercise-induced cardiovascular adjustments are modulated by muscarinic cholinceptors within the ventromedial hypothalamic nucleus. **Physiological Research**, v. 59, n. 2, p. 165, 2010.

WATERS, R. P. *et al.* Selection for aerobic capacity affects corticosterone, monoamines and wheel-running activity. **Physiology & Behavior**, v. 93, n. 4, p. 1044-1054, 2008.

WATSON, P. *et al.* Acute dopamine/noradrenaline reuptake inhibition enhances human exercise performance in warm, but not temperate conditions. **The Journal of Physiology**, v. 565, p. 873-883, 2005.

WISLØFF, U. *et al.* Cardiovascular risk factors emerge after artificial selection for low aerobic capacity. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 418-420, 2005.

ZHENG, X., HASEGAWA, H. Central dopaminergic neurotransmission plays an important role in thermoregulation and performance during endurance exercise. **Eur J Sport Sci.**, 2016.

ZIGMOND *et al.* Triggering endogenous neuroprotective processes through exercise in models of dopamine deficiency. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 1553, p. s42-s45, 20



**ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais**

 <p><b>UFMG</b></p>	<p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b></p> <p><b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b></p>
<p><b>CERTIFICADO</b></p>	
<p>Certificamos que o Protocolo nº. 367 / 2014, relativo ao projeto intitulado “Efeito do treinamento físico sobre a neuroplasticidade dopaminérgica e o desempenho em ratos com diferenças na capacidade intrínseca para o exercício físico”, que tem como responsável Danusa Dias Soares, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 31/03/2015. Este certificado espira-se em 31/03/2020.</p>	
<p><b>CERTIFICATE</b></p>	
<p>We hereby certify that the Protocol nº. 367 / 2014, related to the Project entitled “Effect of physical training on dopaminergic neuroplasticity and performance in rats with different intrinsic exercise capacity”, under the supervision of Danusa Dias Soares, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 31/03/2015. This certificate expires in 31/03/2020.</p>	
<p>Cleuza Maria de Faria Rezende Coordenador(a) da CEUA/UFMG</p>	
<p>Belo Horizonte, 31/03/2015.</p>	
<p>Atenciosamente.</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG</p>	
<p><a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a></p>	
<p>Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>	