

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

GUSTAVO DUARTE FERRARI

**Efeito do exercício físico no metabolismo mitocondrial
de animais modelos para doença de Alzheimer**

Ribeirão Preto – SP

2021

GUSTAVO DUARTE FERRARI

**Efeito do exercício físico no metabolismo mitocondrial
de animais modelos para doença de Alzheimer**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Bioquímica

Orientadora: Luciane Carla Alberici

Versão Corrigida

Ribeirão Preto – SP

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferrari, Gustavo Duarte

Efeito do exercício físico no metabolismo mitocondrial de animais modelos para doença de Alzheimer - Ribeirão Preto, 2021.

76p.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Luciane Carla Alberici

1. Doença de Alzheimer
2. Metabolismo mitocondrial
3. Exercício físico.
4. 3xTG-AD.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gustavo Duarte Ferrari

Efeito do exercício físico no metabolismo mitocondrial de animais modelos para doença de Alzheimer

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Bioquímica

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Resumo

FERRARI, G.D., **Efeito do exercício físico no metabolismo mitocondrial de animais modelos para doença de Alzheimer** 76f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2021.

Introdução: A doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais comum mundialmente, representando cerca de 60-70% do total de demências. O acúmulo de proteína β -amilóide ($A\beta$) e presença de emaranhados neurofibrilares são marcadores clássicos da doença. A mitocôndria possui papel central na fisiopatologia da DA, visto que o acúmulo de $A\beta$ e sua ligação em canais de membrana mitocondrial, prejudica a mitofagia, diminui a dinâmica mitocondrial, e conseqüentemente reduz a capacidade respiratória da célula, sendo o treinamento físico um potente modulador do metabolismo mitocondrial, capaz de gerar efeito neuro protetor. **Objetivo:** Comparar os efeitos de dois tipos de treinamento físico aeróbio (moderada -MOD; e alta intensidade - INT) no metabolismo mitocondrial de tecido cerebral de animais modelo para doença de Alzheimer – 3xTG-AD. **Métodos:** As análises foram realizadas em hipocampo e córtex pré-frontal de animais transgênicos para DA e sua contraparte saudável (C57BL/6;129 - WT). Foram feitos ensaios $A\beta$, por meio de ELISA, citrato sintase (CS) para avaliar conteúdo mitocondrial, respirometria de alta resolução para mensurar o consumo de oxigênio nos tecidos e RT-qPCR a fim de avaliar expressão de genes neurogênicos e metabolismo de glicose. **Resultados:** Observamos uma elevação na capacidade aeróbia dos animais, e tendência ao aumento de fator neurotrófico (BDNF) após ambos protocolos de exercício físico. Os modelos de treinamento não foram capazes de reduzir a concentração de $A\beta$ no hipocampo dos animais transgênicos. Nos animais WT, observou-se uma elevação no consumo de O_2 em todos os estados respiratórios - OXPHOS (37% MOD e 26% INT), LEAK (09% MOD e 49% INT; e ETS (40% MOD e 54% INT). Com relação ao conteúdo mitocondrial, o treinamento moderado reduziu em 38% e o intenso em 47% a atividade de CS. Não foi observada alteração na expressão de GLUT3, com aumento de LDH-A e redução de MCT-2 somente no treinamento intenso. Ambos protocolos causaram um aumento de mRNA de BDH1 nos animais WT. Nos animais transgênicos, houve leve redução no conteúdo mitocondrial no hipocampo frente ao treinamento moderado, com redução em todos os estados de o consumo de O_2 . De forma interessante, essa redução gerou um efeito de “equalização ou normalização” dos estados respiratórios após o treinamento com os valores percebidos pelos animais WT sem atividade física. Houve uma redução de 38% e 47% no conteúdo mitocondrial após os treinamentos moderado e intenso, respectivamente, com redução no consumo de O_2 para fosforilação (20% MOD e 19% INT), desacoplamento (11% MOD e 43% INT) e capacidade respiratória máxima (9% MOD e 37% INT) em animais com DA. Análises de genes da via glicolítica neuronal mostraram elevação na expressão do transportador de glicose (GLUT3) e lactato desidrogenase (LDH-A), com pequena redução de transcrito de transportador de monocarboxilase (MCT-2) e corpos cetônicos (BDH1). **Conclusão:** Os dados apresentados neste trabalho levam a conclusão que o exercício físico de moderada e alta intensidade, realizado por oito semanas é

capaz de elevar fatores neurotrófico (BDNF) e normalizar a capacidade aeróbia de animais da cepa 3xTG-AD e alterar a expressão de genes envolvidos no metabolismo glicolítico de neurônios.

Palavras chave: Doença de Alzheimer; Metabolismo mitocondrial; Exercício físico; 3xTG-AD

Abstract

FERRARI, G.D., **Effect of physical exercise on mitochondrial metabolism in Alzheimer's disease mice model.** 76f. Thesis (Doctorate) –Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2021

Introduction: Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease worldwide, representing about 60-70% of total dementia cases. The accumulation of amyloid- β protein ($a\beta$) and presence of neurofibrillary tangles are hallmarks of the disease. Mitochondria plays a central role in AD pathophysiology, since the accumulation of $a\beta$ and it's binding into mitochondrial membrane channels impairs mitophagy, abolish mitochondrial dynamics, and reduces respiratory capacity, all of which are modulated by physical exercise, a powerful neuroprotector. **Objective:** we aimed to compare the effect of two types of physical training (moderate – MOD; and high-intensity - INT) on brain mitochondrial metabolism of mice model of AD – 3xTG-AD. **Methods:** The analysis were performed in the hippocampus and prefrontal cortex of transgenic mice and its healthy counterpart (C57BL/6; 129 – WT). $A\beta$ assays were performed using ELISA, citrate synthase (CS) to assess mitochondrial content, high-resolution respirometry to analyze oxygen consumption in tissues and RT-qPCR to verify mRNA expression of glucose metabolism genes. **Results:** We observed an increase in the aerobic capacity of the animals, and an upward tendency in the brain derived neurotrophic factor (BDNF) after both exercise protocols. The training models were not able to reduce $A\beta$ in the hippocampus of 3xTG-AD mice. In WT animals, an increase in O_2 consumption was observed in all respiratory states – OXPHOS (37% MOD and 26% INT), LEAK (09% MOD and 49% INT), and ETS (40% MOD and 54% INT). Regarding mitochondrial content, moderate training reduced CS by 38% and high-intensity training reduced CS by 47%. There was no change in mRNA levels of GLUT3, with an increase in LDH-A and a slight reduction in MCT-2, only in the INT group. Both protocols caused an increase in BDH1 mRNA in WT mice. In transgenic animals there was a slight reduction in mitochondrial content in hippocampus as a result to moderate training, with a reduction in all respiratory states. Interestingly, this reduction generated a “equalization or normalizing” effect of O_2 consumption states after training with the initial values of WT animals (control group). There was a 38% and 47% reduction in mitochondrial content after moderate and intense training, respectively, with a reduction in phosphorylation O_2 consumption (20% MOD and 19% INT), uncoupling (11% MOD and 43% INT), and maximal respiratory capacity rate (9% MOD and 37% INT) in AD animals. Glycolytic pathway gene analysis showed an increase in GLUT3 and LDH-A expression, and a small reduction of MCT-2 and BDH-1) **Conclusion:** The data presented in this work leads to the conclusion that eight weeks of moderate and high-intensity physical exercise, are able to increase BDNF and aerobic capacity, normalize mitochondrial respiration of 3xTG-AD mice, and modulate the expression of genes involved in neurons glucose metabolism.

Keywords: Alzheimer's disease; Mitochondrial metabolism; Physical exercise; 3xTG-AD

Dedicatória

Este trabalho é dedicado à minha esposa, Jaqueline, que sempre me apoiou e acreditou em mim mesmo nos momentos em que eu duvidei.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha orientadora, **Luciane**, por me aceitar em seu laboratório e aturar meus momentos espalhafatosos. Me guiou pelos tortuosos caminhos da bioquímica sempre me empurrando e acreditando em mim e me dando força nos momentos de necessidade. Você tem minha eterna admiração e gratidão, Lu.

A todos meus colegas de laboratório, em especial ao **Henrique**, que em breve período sob minha orientação foi de suma importância para o desenvolvimento deste trabalho. Ao **Jhonny Boy**, que com sua paciência soube perdoar meus momentos de raiva e sempre estar à disposição para me ajudar. Agradeço especialmente ao fofo, **Carlos Dechandt**, que sempre me tirava de momentos de concentração extrema para fofocar ou chamar para um café. Sua presença fez meus dias mais leves e prazerosos no laboratório. Você fez falta na reta final.

Ana Elisa, a melhor técnica de laboratório a pisar no prédio da faculdade de Farmácia da USP de Ribeirão. Seu conhecimento e paciência foram imprescindíveis para a conclusão deste projeto.

A professora **Carol**, que em breves conversas me fez aguentar a pressão da pós-graduação e seguir em frente, acreditando no futuro.

Agradeço a **Ivone**, que sempre me aturou na secretaria, aguentando minhas invasões e petulâncias com bom humor. Você é muito especial, fofa!

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, por fomentar minha bolsa de estudos durante esse período.

Sumário

1. Introdução.....	6
1.1. A doença de Alzheimer	6
1.2. A hipótese β -amilóide.....	7
1.3. A hipótese de proliferação de TAU	8
1.4. A hipótese colinérgica	8
1.5. A hipótese mitocondrial	10
1.6. Hereditariedade.....	11
1.7. Camundongo 3xTG AD	13
1.8. Exercício físico e a doença de Alzheimer.....	14
1.9. Exercício aeróbio e alterações mitocondriais	15
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Material e métodos	19
3.1. Modelo experimental.....	19
3.2. Protocolos de treinamento físico e teste de esforço.....	19
3.3. Eutanásia e retirada dos tecidos	21
3.4. Extração e quantificação de mRNA	21
3.5. Detecção de β -amilóide	23
3.6. Consumo de oxigênio.....	24
3.7. Atividade de citrato sintase	25
4. Resultados.....	26
4.1. Validação do modelo animal	26
4.2. Teste de treinamento e capacidade física.....	27
4.3. Atividade de citrato sintase	29
4.4. Consumo de oxigênio.....	30

4.4.1. Hipocampo.....	30
4.5. Córtex pré-frontal	35
4.6. Efeito do exercício físico sobre marcadores da DA.....	39
4.7. Efeito do exercício físico na reciclagem de A β	39
4.8. Metabolismo energético	40
5. Discussão	43
5.1. Protocolo de treinamento físico aeróbio.....	43
5.2. Metabolismo energético mitocondrial.....	45
5.3. Exercício e proteína amilóide- β	48
5.4. Análise de genes da via glicolítica	49
6. Conclusão.....	52
7. Sugestões para trabalhos futuros	53
8. Referências.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vias de clivagem de APP. Editado do trabalho de Claassen e colaboradores (2012)	9
Figura 2 - Ciclo da acetilcolina. Editado do trabalho de Hampel et al (2018) ..	11
Figura 3: Atrofia neuronal via redução de mitofagia. Editado do trabalho de Liu et al (2019)	12
Figura 4 - Protocolo de treinamento intenso.....	20
Figura 5 - Genotipagem dos animais WT e 3xTG-AD em gel de agarose 3% ..	26
Figura 6 - Análise da presença de β -amilóide total e Nusc1 em hipocampo de animais WT e 3xTG-AD; D.O.= densidade ótica; n=9; dados expressos em média \pm desvio padrão.....	27
Figura 7 - Velocidade no teste de esforço em esteira; (A) dados gerais do teste pré treinamento físico; n=36 (B) velocidade pré e pós 8 semanas de treinamento físico de cada grupo; n=12; MOD: moderado; INT: intenso; Teste t pareado; * $p < 0.05$; dados expressos em média \pm erro padrão.....	28
Figura 8 - Expressão de mRNA do gene BDNF no córtex pós treinamento físico; n=6; dados expressos em média \pm erro padrão.....	28
Figura 9 - Unidades de citrato sintase no (A) córtex pré-frontal e (B) hipocampo, após o protocolo de treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; n=6; dados expressos em média \pm erro padrão.....	30
Figura 10: Respiração de hipocampo de animais WT e 3xTG-AD, normalizado por mg de proteína, após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; n=6; dados normalizados por mg de proteína e expressos em média \pm erro padrão.....	31
Figura 11: Respiração de hipocampo de animais WT e 3xTG-AD, normalizado por CS, após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; n=6; dados expressos em média \pm erro padrão. .	33
Figura 12: Razões entre os estados respiratórios no hipocampo, normalizados por CS. Animais WT e 3xTG-AD após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; n=6; dados expressos em média \pm erro padrão.....	35

Figura 13: Respiração de córtex de animais WT e 3xTG-AD, normalizados por mg de proteína, após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; dados expressos em média \pm erro padrão.	36
Figura 14: Respiração de córtex de animais WT e 3xTG-AD, normalizados por CS, após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; dados expressos em média \pm erro padrão.	37
Figura 15: Expressão de mRNA de NMDAR2 no hipocampo após treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; dados expressos em média \pm erro padrão.	39
Figura 16: Acúmulo de A β no hipocampo de animais 3xTG-AD nos diferentes grupos de treinamento físico.	40
Figura 17: Expressão de genes da via glicolítica no hipocampo após treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; n=6; # = diferença entre os grupo CT de animais WT e 3xTG-AD; dados expressos em média \pm erro padrão.	42
Figura 19: Interação astrócito-neurônio no metabolismo energético e sináptico de humanos.	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Genes e primers para RT-qPCR.....	22
Tabela 2: Razões entre os estados respiratórios no córtex pré-frontal, normalizados por CS.....	38

1. Introdução

1.1. A doença de Alzheimer

Descrita inicialmente em 1906 por Alois Alzheimer como uma demência que deteriora a capacidade cognitiva do paciente de forma progressiva causando agressividade, alucinações e perda de memória recente, a doença de Alzheimer (DA) é tida como uma das primeiras condições a iniciar o campo de estudos das estruturas cerebrais e o comportamento humano (HERRUP, 2010).

A doença de Alzheimer (DA) é a doença neurodegenerativa mais comum mundialmente. Esta condição representa cerca de 60-70% de todas as demências em pessoas idosas (KUMAR e colab., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Aproximadamente 9,9 milhões de pessoas desenvolvem algum tipo de demência todo ano, sendo que 63% residem em países de baixa ou média renda. Mundialmente, estima-se que 50 milhões de pessoas sejam acometidas com demência de Alzheimer. É projetado que esse número suba para 574 milhões até 2030 (World Health Organization, 2018).

Em 2011, havia aproximadamente 1 milhão de casos de DA no Brasil (SOARES e colab., 2017). Infelizmente, não há dados nacionais recentes sobre a prevalência desta doença, gerando apenas especulações sobre o número de casos. Na época, especulava-se 35 milhões de casos, mundialmente. Em uma proporção simplificada, no Brasil, atualmente, teríamos cerca de 1,4 milhão de casos. Equivalendo à 0,6% da população brasileira em 2020.

A doença de Alzheimer não representa apenas um peso para o paciente e sua família, como também um problema para o sistema de saúde com grande impacto econômico, uma vez que o tratamento da doença é primariamente composto de terapias medicamentosas, normalmente de alto custo. Ao todo, o custo do tratamento de DA foi cerca de US\$ 604 bilhões no ano de 2010 (ALZHEIMER DISEASE INTERNATIONAL, 2014; WIMO e colab., 2013). No mesmo ano, no Brasil o custo estimado foi de US\$ 7 bilhões e 200 mil, enquanto na Europa, em 2005 foram gastos aproximadamente €160 bilhões (RELATÓRIO ADI/BUPA, 2013; WIMO e colab., 2006).

As alterações clássicas vistas em autópsias de pacientes com DA incluem a presença de emaranhados neurofibrilares (compostos por proteína Tau hiperfosforilada), aglomerados de peptídeo β -amilóide ($A\beta$) centrais e periféricos e perda de massa cinzenta (CUMMINGS e colab., 2012).

A observações de tais traços deu origem a várias hipóteses acerca da fisiopatologia da DA, (1) a hipótese β -amilóide, (2) a hipótese Tau e (3) a hipótese colinérgica (KUMAR e colab., 2015; KURZ e PERNECZKY, 2011). De 2.173 ensaios clínicos realizados no ano de 2019, mais da metade (53,4% - 1.160) foram focados nestas hipóteses (LIU, Pei-Pei e colab., 2019).

Outra hipótese mais recente vem ganhando destaque nas discussões acerca da DA, a hipótese de cascata mitocondrial, onde essa organela exerce uma função chave na progressão da doença (LIU, Pei-Pei e colab., 2019).

Debates ainda permeiam o campo da fisiopatologia da DA, tendo como único consenso que esta é uma doença multifatorial, porém, a hipótese β -amilóide tem sido de grande interesse atualmente.

1.2. A hipótese β -amilóide

Cunhada em 1992 (HARDY e HIGGINS, 1992), a hipótese β -amilóide dita que o processo de neurodegeneração da DA é causado, em grande parte, pela formação de placas compostas de proteínas β -amilóide, causando toxicidade e consequente morte celular (FOLCH e colab., 2018). A proteína β -amilóide tem sua origem pela clivagem de uma proteína precursora, a proteína precursora de amilóide (APP – *amyloid precursor protein*). A APP é uma proteína transmembrana, podendo ser clivada por duas vias (via não amiloidogênica ou fisiológica; e via amiloidogênica). As vias de clivagem de APP são definidas de acordo com a enzima responsável pela quebra desta proteína, sendo elas α , β e γ -secretase. A via fisiológica se inicia pela clivagem da APP pela α -secretase gera o fragmento extracelular (s)APP α e o fragmento c-terminal composto de 83 aminoácidos (C83) que se mantém ancorado na membrana. A porção (s)APP α tem função regulatória na excitabilidade neural, melhora na plasticidade sináptica, aprendizado, memória e eleva a resistência neural ao estresse oxidativo e metabólico. De forma alternativa, a via patológica ou amiloidogênica tem seu início com a ação da β -secretase 1 (BACE), clivando a APP na porção

N-terminal, seguida da clivagem da porção C-terminal restante pela γ -secretase, gerando (s)APP β , as frações amilóide β com 40 e 42 resíduos – A β 40/42 e um fragmento c-terminal com 99 aminoácidos (C99). Esta porção pode ser transportada para o núcleo e ativar fatores apoptóticos (HAASS e colab., 2012; MUCKE e SELKOE, 2012). Este processo é ilustrado na figura 1.

1.3. A hipótese de proliferação de TAU

Outra hipótese que é amplamente reconhecida e, de certa forma, disputa com a hipótese β -amilóide o foco das discussões sobre a etiologia da DA e a teoria de que a primeira etapa da doença é a de hiperfosforilação da proteína TAU.

A TAU é uma proteína associada aos microtúbulos neuronais que regula e estabiliza os arcabouços de tubulina (GOEDERT, M e colab., 1989). Um dos pontos chave da DA, como citado, é a formação de emaranhados neurofibrilares, tais emaranhados são formados por agregados de proteína TAU, que ao serem fosforilados em vários sítios (a proteína contém dez possíveis sítios fosforiláveis) (KAMETANI e HASEGAWA, 2018), se desestabilizam e se tornam hidrofóbicos e se unindo em “placas”. A elevação nas concentrações destes emaranhados se correlaciona fortemente com o declínio cognitivo característica da DA (BRAAK e BRAAK, 1991). É notável e bem caracterizado a importância da formação dos emaranhados neurofibrilares para o diagnóstico da DA, a discussão que ainda se mantém é sobre qual seria o primeiro fator a ser o gatilho da doença. Interessantemente, foi demonstrado que o aumento da APP se correlaciona com a elevação e propagação de TAU pelo tecido cerebral, uma vez que o tipo anormal de TAU é capaz de se propagar pelas células, possivelmente por meio de APP (GOEDERT, Michel e SPILLANTINI, 2017; HASEGAWA, 2016; TAKAHASHI e colab., 2015).

1.4. A hipótese colinérgica

As duas hipóteses supra citadas são amplamente reconhecidas pela fisiopatologia da DA em pacientes mais jovens (*early onset Alzheimer's Disease*) ao passo que a hipótese colinérgica tenta compreender os eventos metabólicos e fatores para o acometimento tardio da DA (*late onset Alzheimer's Disease*). Para tal evento, são fatores de risco clássicos a idade avançada, a presença do alelo $\epsilon 4$ da Apolipoproteína E (APOE $\epsilon 4$) e fatores cardiovasculares e de estilo de vida ainda não bem elucidados (DE BRUIJN e IKRAM, 2014; HEBERT e colab., 1995; SHI e colab., 2017).

A constatação de marcadores colinérgicos esgotados no córtex, a descoberta de que áreas responsáveis pela fonte de inervações colinérgicas corticais são gravemente afetados pela neurodegeneração proveniente da DA e evidências de que antagonistas colinérgicos prejudicam a memória, ao passo que agonistas melhoram são as bases para a elaboração da hipótese colinérgica (HAMPEL e colab., 2018). O ciclo da acetilcolinesterase é ilustrado na figura 2.

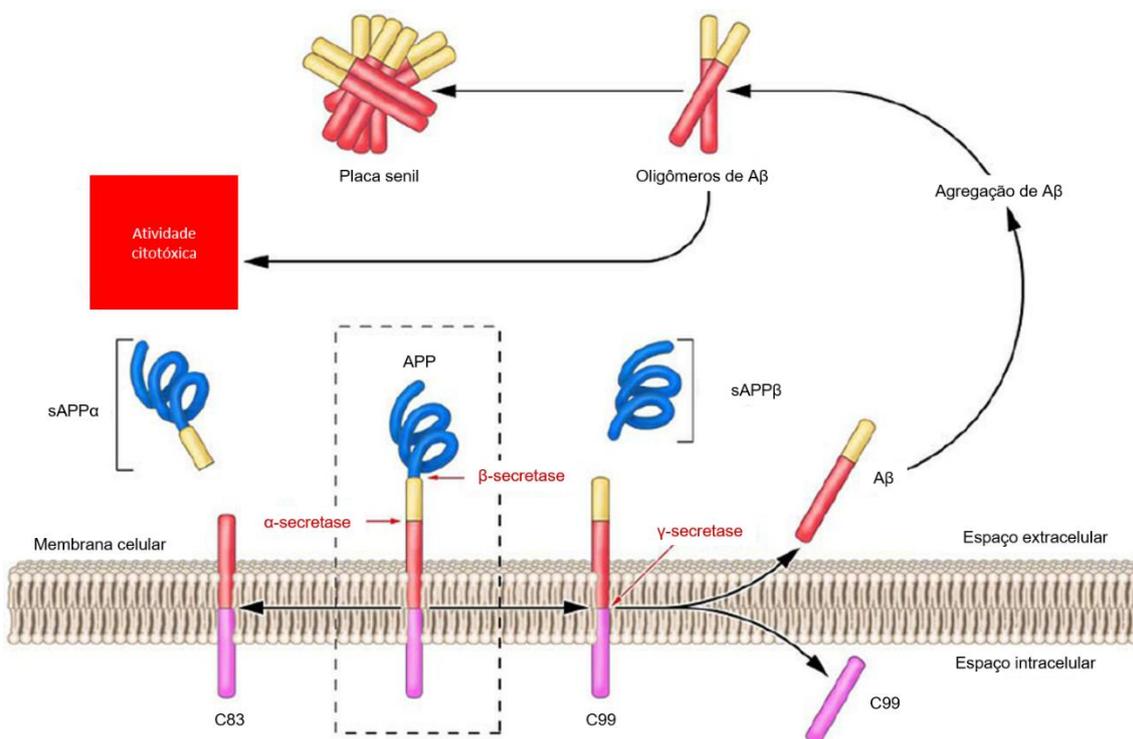


Figura 1: Vias de clivagem de APP. Editado do trabalho de Claassen e colaboradores (2012)

A via colinérgica se inicia com a formação de acetilcolina (AC) por meio de união de Acetil CoA e Colina sob ação da enzima colina aciltransferase. O neurotransmissor AC é liberado na fenda sináptica onde se liga ao seu receptor

M1 do neurônio pós-sináptico, possibilitando a passagem do estímulo nervoso. O excesso do neurotransmissor é clivado por meio da enzima acetilcolinesterase, sendo quebrado em colina e acetato, que são recaptados pelo neurônio pré-sináptico para ressíntese do neurotransmissor.

1.5. A hipótese mitocondrial

Em 2004 foi proposta uma nova hipótese para a fisiopatologia da DA, tendo a mitocôndria como peça chave (SWERDLOW e KHAN, 2004). Em 2019, 17% dos ensaios clínicos foram focados na participação mitocondrial na DA, número maior do que da hipótese TAU (LIU, Pei-Pei e colab., 2019). As mitocôndrias são as principais fontes de produção de estresse oxidativo celular, sendo esta produção exacerbada quando as organelas se encontram danificadas (HOLMSTRÖM e FINKEL, 2014; RAY e colab., 2012). Foi demonstrado que o acúmulo de proteína β -amilóide, característico da DA, se liga em canais de membrana mitocondrial, prejudicando a mitofagia, diminuindo o *turnover* mitocondrial, conseqüentemente reduzindo a capacidade respiratória da célula e elevando sua produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), sendo possível causa de atrofia neuronal – ilustrado na figura 3 (LIU, Pei-Pei e colab., 2019). Ademais, a estimulação de mitofagia é capaz de reduzir a concentração de β -amilóide e eliminar a fosforilação de TAU relacionada com a DA (FANG e colab., 2019; KERR e colab., 2017).

Com a diminuição da mitofagia e conseqüente aumento no número de mitocôndrias deficitárias, os substratos energéticos produzidos e reciclados pela organela reduzem sua concentração. Tais substratos, como acetil-CoA e α -cetogluturato são necessários para regulações epigenéticas como metilação de DNA e metilação e acetilação de histonas (MATILAINEN e colab., 2017). Desta forma, a participação das mitocôndrias na progressão da DA não se resume apenas ao estresse oxidativo no tecido neural, mas também na desregulação de mecanismos de controle epigenético, deficiência na eliminação de β -amilóide e hiperfosforilação de TAU. De fato, terapias que visam melhorar a performance mitocondrial, como administração de oxaloacetato (substrato mitocondrial) foi capaz de estimular a produção de energia, elevar biossíntese mitocondrial e reduzir inflamação no cérebro (WILKINS e colab., 2014).

1.6. Hereditariedade

Há mais de duas décadas, foi estipulado que a heritabilidade da doença de Alzheimer era de 60-80%, em um estudo realizado com gêmeos suíços (GATZ e colab., 1997). Em um segmento do mesmo grupo da doutora Gatz, na maior análise de gêmeos feita na época, foi estabelecido o valor entre 56-79% de hereditariedade para a DA de acometimento tardio (GATZ e colab., 2006). Em casos precoces de DA, que representam 5% dos casos da doença (SIMS e colab., 2020) cerca de 90% da doença é considerada de cunho hereditário, com múltiplos genes como fator de risco (WINGO e colab., 2012).

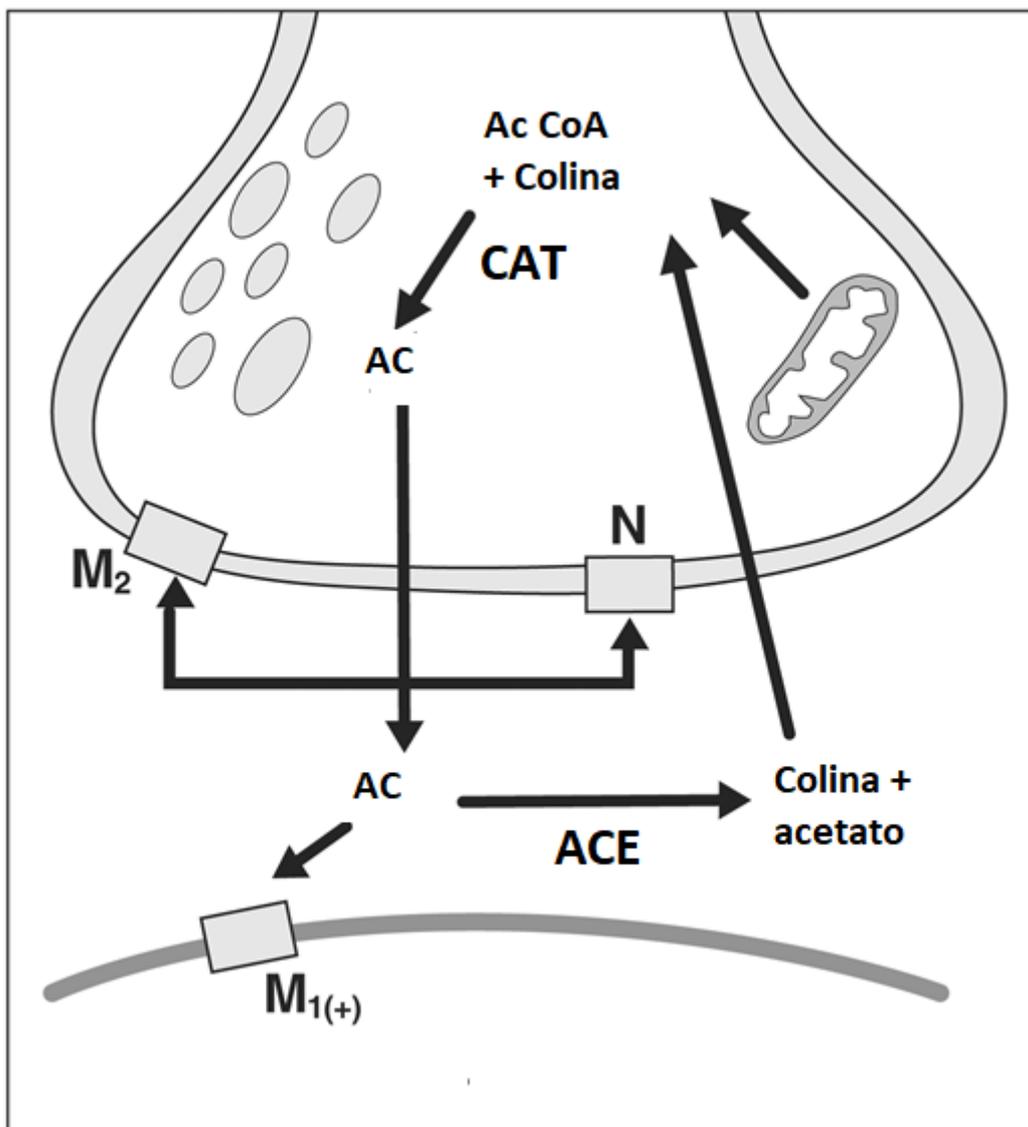


Figura 2 - Ciclo da acetilcolina. Editado do trabalho de Hampel et al (2018).

Estudos com gêmeos são importantes para analisar hereditariedade de qualquer fenótipo, uma vez que é possível identificar de forma mais direta o efeito genético. Isto se dá pela capacidade de dividir os indivíduos em gêmeos Monozigotos (MZ) ou dizigotos (DZ). Se o número de casos em que ambos irmãos MZ apresentam a doença seja maior que o número de casos em que irmãos DZ sejam acometidos, há forte sugestão de herança genética, uma vez que MZ compartilham 100% do DNA, enquanto DZ compartilham somente 50%. Com esses dados é possível inferir os níveis de influência genética e ambiental no desenvolvimento da doença.

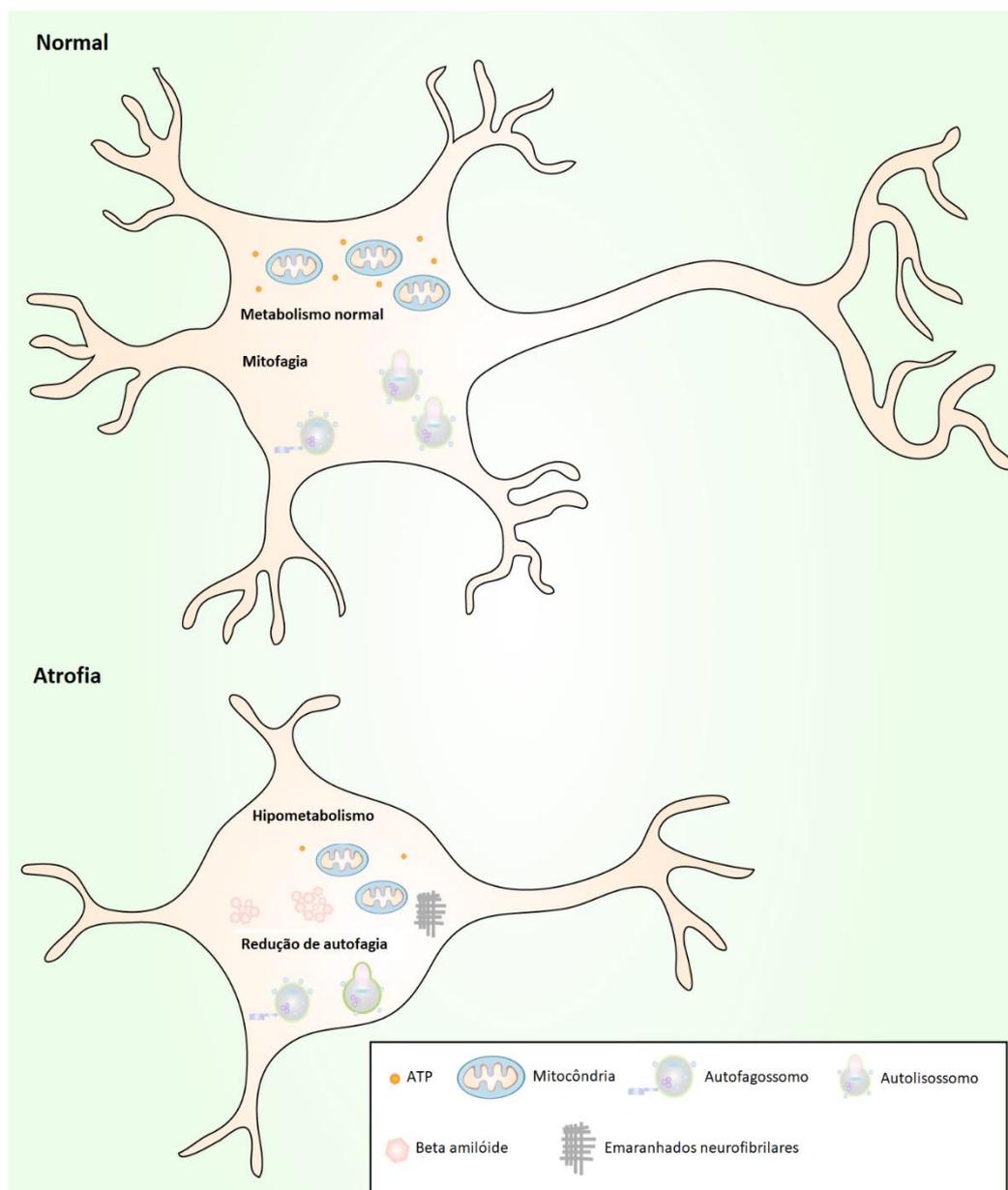


Figura 3: Atrofia neuronal via redução de mitofagia. Editado do trabalho de Liu et al (2019)

1.7. Camundongo 3xTG AD

Vários modelos animais foram elaborados para auxílio no estudo da DA, alguns modelos, como o de administração de estreptozotocina intracerebroventricular são amplamente utilizados para estudos acerca das alterações neurais da DA esporádica (CHEN, Yanxing e colab., 2013), enquanto modelos como o 5xFAD e APP^{swe}/PS1 Δ E9 (também chamado de 2xTG-AD) são utilizados para estudar formas congênitas autossômicas dominantes (HALL e ROBERSON, 2012).

No ano de 2003, a cepa 3xTG-AD de camundongos transgênicos para DA foi desenvolvida pelo laboratório Jackson por meio de inserção de dois transgenes humanos (APP^{swe}, and tauP301L) em outra cepa modificada que carregava o transgene PS1M146V (ODDO e colab., 2003). Desta forma, foi possível criar a cepa 3xTG-AD que exhibe a formação de placas senis (β -amilóide) e emaranhados neurofibrilares (TAU hiperfosforilada). O transgene tauP301L eleva a produção de TAU hiperfosforilada; a mutação APP^{swe} aumenta os transcritos de APP, aumentando a concentração de sítios para clivagem da proteína e formação de A β , enquanto PS1M146V é uma mutação no gene PS1 (presenilina1), uma subunidade catalítica da enzima γ -secretase, elevando a liberação de A β .

A cepa 3xTG-AD foi caracterizada, no ano de 2010, por Sterniczuk e colaboradores tanto por suas alterações em ritmo circadiano como comportamentais e cognitivas (STERNICZUK e ANTLE e colab., 2010; STERNICZUK e DYCK e colab., 2010). Os animais exibiram formação de placas senis e emaranhados neurofibrilares primeiramente na região CA1 do hipocampo, sendo a formação de placas de A β presentes a partir de 3 meses de idade e a presença de emaranhados neurofibrilares em algumas células aos 2 meses de idade (MASTRANGELO e BOWERS, 2008). Aos seis meses de idade, os animais apresentam danos a capacidade de aprendizado, memória e retenção de memória (STERNICZUK e ANTLE e colab., 2010; STOVER e colab., 2015). As alterações neurais geradas pelos transgenes nesta cepa não prejudicaram a força de preensão, a coordenação motora ou a coordenação visomotora dos animais (STERNICZUK e ANTLE e colab., 2010).

1.8. Exercício físico e a doença de Alzheimer

O exercício físico é estudado como forma de prevenção e tratamento não medicamentoso de doenças há mais de 100 anos (SNEVE, 1910), sendo investigado primordialmente em doenças pulmonares (ANDERS, 1913; FERGUSON, 1934; MACMAHON, 1915) e cardíacas (CARLSTRÖM, 1910; HARRIS, 1921; WHITE, 1927). De fato, seu potencial benéfico sobre a saúde geral do corpo é reconhecido anteriormente à era corrente:

“Ora, a condição do corpo não é deteriorada pelo repouso e pelo ócio, ao passo que é preservada[...]pelos exercícios de ginástica e pelos movimentos?” – Platão, 427-347(a .C.) (EDSON, 2013).

Interessantemente, a importância do exercício físico para o bem estar de uma nação em geral é reconhecida desde o início do século XX (POSSE, 1910). Sua relação com o sistema cardiorrespiratório é intuitiva, porém o interesse por seus benefícios para pacientes com doenças cognitivas também são estudados há mais de noventa anos (MEESE, 1930).

Para DA, especificamente, pesquisas com intuito de observar as alterações promovidas pelo exercício físico são mais recentes e focadas em alterações comportamentais (SMITH e BRANDT, 1979). Análises mais profundas, como alterações em estruturas cerebrais foram publicadas na década de 1980, com uso de experimentação animal, permitindo a observação “imediate” do efeito causado pela atividade física em cérebros doentes (MIRMIRAN e colab., 1986).

Atualmente, a relevância e indispensabilidade do exercício físico como acessório no tratamento de doenças cognitivas é amplamente reconhecida (CASS, 2017; CHEN, Wei-Wei e colab., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018), gerando diversos modelos de treinamento físico para estudos da doença (modelos animal e humano), como natação (LOURENCO e colab., 2019), aeróbio em cicloergômetro (YANG e colab., 2015) e esteira rolante (VIDONI e colab., 2019) e treinamento de força (KWAK e colab., 2008).

Para modelos animais, os principais modelos de exercício físico utilizados são o treinamento em esteira e o exercício voluntário em roda de corrida

(PALANDI e colab., 2020). Este último modelo se baseia na intenção voluntária do animal de se exercitar, sem controle de tempo, frequência ou intensidade, tornando difícil a estruturação de um modelo de treinamento que possa ser aplicado em humanos a fim de gerar os benefícios observados. Em contrapartida, o exercício físico em esteira permite o controle total das variáveis de treinamento, como o controle da velocidade, da inclinação, o tempo de duração de cada sessão e sua frequência semanal. Desta forma, a fim de gerar um protocolo aplicável em seres humanos que possa ser difundido e recomendado como forma de tratamento/prevenção, este modelo parece ser mais interessante.

1.9. Exercício aeróbio e alterações mitocondriais

O interesse pelos efeitos do exercício físico no metabolismo mitocondrial tem crescido amplamente, principalmente no que tange sua capacidade de auxiliar no tratamento de doenças, bem como em sua prevenção. Patologias que acometem o sistema muscular esquelético (PICCA e colab., 2019), cardíaco (BOULGHOBRA e colab., 2020), pulmonar (BERENJEIAN TABRIZI e colab., 2017), hepático (STEVANOVIĆ e colab., 2020), renal (KESTENBAUM e colab., 2020), enfim, praticamente todos são alvo de investigação com protocolos de atividade física. A capacidade do exercício físico de modular a biogênese mitocondrial (GRANATA e colab., 2018; LIMA e colab., 2017), influenciar na dinâmica mitocondrial (TREWIN e colab., 2018) e alterar capacidade respiratória (TREWIN e colab., 2017) é conhecida em grande parte dos tecidos.

O treinamento físico é capaz de alterar a biogênese mitocondrial no músculo esquelético (e conseqüentemente capacidade respiratória) por dois principais fatores, o uso de substratos energéticos e o estresse da contração muscular em si. O uso de substrato eleva a razão $NAD^+ : NADH$ e $AMP : ATP$. Essas alterações são percebidas por SIRT1 e AMPK, respectivamente, gerando a deacetilação dos genes PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* – regulador central da biogênese mitocondrial) e p53 (modulador de dinâmica mitocondrial) e fosforilando as proteínas PGC-1 α , p53, ATF2 (*activating transcription fator 2* – eleva a atividade de transcrição), SIRT1 e HDAC (sirtuina1 e *hystone deacetylase* – deacetilação de fatores de

transcrição). Adicionalmente, estresse mecânico da contração eleva o influxo de cálcio na célula muscular, sinalizando para a fosforilação de CREB (*cAMP responsive element binding protein 1* – indução de fatores de transcrição) e HDAC - para revisão, ver (GRANATA e colab., 2018).

A principal função mitocondrial é a geração de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), por meio da fosforilação oxidativa. Macronutrientes (glicose, aminoácidos e lipídios) são utilizados para obtenção da molécula de Acetil-CoA, necessária para o primeiro estágio do ciclo do ácido tribarboxílico (ciclo do TCA ou ciclo de Krebs). Em suma, o ciclo de Krebs consiste na oxidação do acetil-CoA através de 8 reações (formação de citrato → cis-aconitato → isocitrato → α -cetogluturato → succinil-CoA → succinato → fumarato → malato → oxaloacetato), gerando a cada ciclo, 3 moléculas de NADH, uma molécula de FADH₂ (coenzimas reduzidas) e um ATP. Este processo se dá na matriz mitocondrial.

Após síntese, as coenzimas reduzidas NADH e FADH₂ doam seus elétrons na cadeia transportadora de elétrons (CTE), na qual a passagem ordenada de elétrons por quatro complexos proteicos mitocondriais, gera um gradiente eletroquímico no espaço intermembrana utilizado como força próton motriz para geração de ATP. A CTE consiste em três complexos transmembrana interna mitocondrial (complexos I, III e IV), permitindo a passagem de prótons (H⁺) para o espaço intermembrana e um complexo ancorado na membrana interna (complexo II), sendo acoplada à ATP sintase, as vezes chamado de complexo V.

De forma geral, NADH doa seus elétrons para o complexo I, bombeando quatro prótons para o espaço intermembrana, esses elétrons são transportados pela ubiquinona (coenzima Q) para o complexo III, novamente gerando o transporte de quatro íons de 4H⁺ para o espaço intermembrana. Os elétrons são transferidos do complexo III para o citocromo C, uma proteína solúvel no espaço intermembrana, que os transfere (um por vez) para o complexo IV, onde ocorre a passagem de 2 prótons para o espaço intermembrana e a redução do oxigênio molecular à água (H₂O).

O complexo II mitocondrial não é capaz de bombear prótons para o espaço intermembrana, uma vez que está ancorado na membrana interna. Também chamado de succinato desidrogenase, é a única enzima do ciclo de

Krebs ligada a membrana mitocondrial, onde ocorre a acepção de elétrons provindos da coenzima $FADH_2$, sendo transferidos para ubiquinona, dando sequência a CTE.

Para a conservação de energia em forma de ATP, os prótons bombeados para o espaço intermembrana pelos complexos I-IV são enviados de volta para a matriz através da ATP sintase. Por meio da catálise rotacional, a ATP sintase utiliza a força próton-motriz para catalisar a reação $ADP-Pi$ (adenosina difosfato + fosfato inorgânico), formando ATP (LEHNINGER e colab., 2014).

O exercício físico é reconhecido por elevar biogênese mitocondrial no hipocampo (E e colab., 2014), aumento na atividade antioxidante (superóxido dismutase e catalase) (UM e colab., 2011) e redução na produção de EROS (BO e colab., 2014). Apesar do conhecimento sobre a interação exercício físico X mitocôndria, o estudo acerca de alterações energéticas dessa relação em modelos da DA ainda é escasso, sendo a maioria dos estudos focados na análise de vias antioxidantes (GARCÍA-MESA e colab., 2016; GIMÉNEZ-LLORT e colab., 2010; WANG e colab., 2013). Adicionalmente, devido à praticamente infinita quantidade de protocolos de exercício possíveis, a elaboração de um modelo de treinamento que possa gerar mudanças benéficas ao paciente de DA se torna difícil.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como intuito comparar os efeitos de dois tipos de treinamento físico aeróbio (moderada e alta intensidade) no metabolismo mitocondrial de tecido cerebral de animais modelo para doença de Alzheimer – 3xTG-AD.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar o efeito do treinamento aeróbio moderado e de alta intensidade na capacidade física de animais C57BL/6;129 (WT) e 3xTG-AD.
- Analisar as alterações no conteúdo mitocondrial e estados respiratórios induzidas por ambos os protocolos de exercício no hipocampo e córtex pré-frontal dos animais.
- Investigar a influência dos protocolos de exercício na transcrição de genes relacionados ao metabolismo energético no tecido cerebral.

3. Material e métodos

3.1. Modelo experimental

Foram utilizados animais transgênicos modelo para doença de Alzheimer e suas contrapartes *wild type* (3xTG-AD e WT). Os animais 3xTG-AD são um modelo amplamente utilizado nas pesquisas de DA com influência genética. Tal modelo animal contém cópias de três genes humanos relacionados com a DA, proteína precursora de amilóide (APP), presenilina1 e proteína TAU.

Os animais foram reproduzidos e mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), tendo acesso a comida e água à vontade. O ciclo diurno/noturno (12h/12h) dos animais foi invertido para que o treinamento em esteira fosse realizado no ciclo noturno dos animais. A temperatura da sala foi mantida em 23 ± 2 °C durante todo período de permanência dos animais.

Após o desmame (aproximadamente 21 dias) foi realizada a sexagem dos animais e os machos foram usados para os experimentos. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFRP (protocolo nº 18.1.6.60.1).

3.2. Protocolos de treinamento físico e teste de esforço

Os animais (aproximadamente 40 dias de vida) foram adaptados a esteira onde seriam treinados, por 5 dias, a fim de familiarizá-los ao aparato e o treinamento não fosse prejudicado. No primeiro dia e segundo dias os animais foram colocados na esteira desligada, sem inclinação e mantidos por 10 minutos. No dia seguinte, foram colocados na esteira em velocidade de 5 m/m (velocidade lenta), sem inclinação por 10 minutos. No quarto dia, a adaptação foi feita a 5 m/m com inclinação de 10°. No último dia de adaptação os animais foram colocados na esteira por 10 minutos, a 5 m/m e inclinação de 20°.

O teste de esforço e os treinamentos foram realizados com inclinação de 20° (máximo da esteira) para que os animais não parassem o exercício de forma prematura devido à impossibilidade de acompanhar a velocidade de esteira

devido ao seu tamanho. Foi demonstrado que ratos e camundongos atingem sua capacidade máxima respiratória em esteira com inclinação de 20-25° (WISLOFF e colab., 2001).

Após o período de adaptação, todos os animais realizaram um teste de esforço, para determinar a velocidade máxima de corrida individual. O teste foi realizado com 20° de inclinação. Os animais passaram por um aquecimento de cinco minutos a 5 m/m, subsequentemente, a velocidade foi elevada para 9 m/m e o teste foi iniciado. A velocidade foi elevada em 2m/m a cada 2 minutos, com elevação constante (WISLOFF e colab., 2001).

Os animais foram divididos em 3 grupos por cepa, sendo 1) sedentário (CT); 2) treinamento contínuo moderado (MOD); e treinamento intervalado de alta intensidade (INT). O grupo MOD realizou o treinamento 5 vezes por semana, com duração de 30 minutos em velocidade correspondente à 50% do valor obtido no teste. O grupo INT realizou 5 minutos de aquecimento à 50% da velocidade do teste, esta etapa será seguida por 4 baterias de 2 minutos a 70% intervaladas por 1 minuto à 50% da velocidade do teste, 3 vezes por semana em dias alternados (Figura 4). A velocidade de 70% do valor do teste representa ~90% da frequência cardíaca máxima dos animais (WISLOFF e colab., 2001). Para equalização dos grupos, os animais foram divididos de forma equivalente de acordo com os níveis de velocidade obtidas no teste, desta forma, a diferença de capacidade física inicial não é um fator que afeta o desfecho do treinamento.

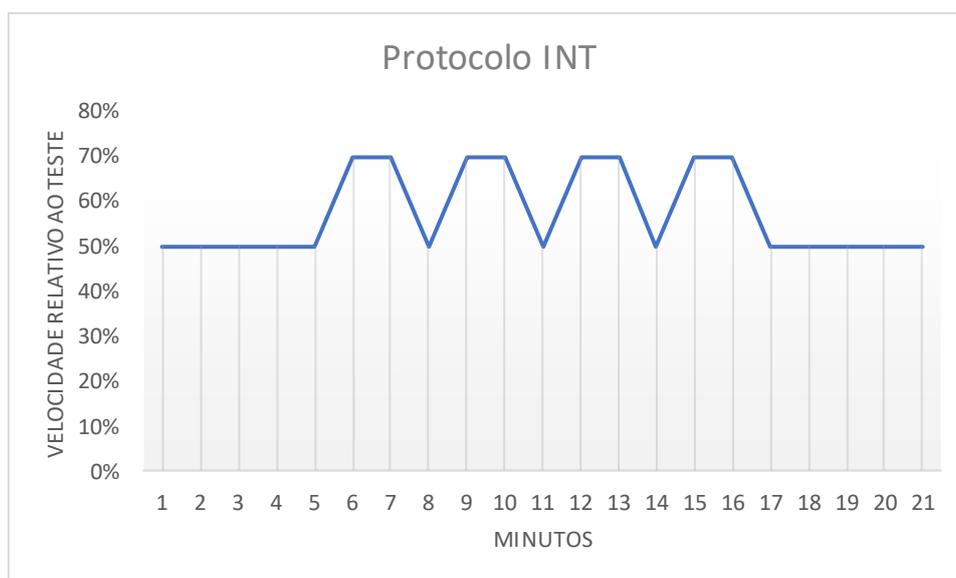


Figura 4 - Protocolo de treinamento intenso

A intervenção com treinamento físico teve duração de 8 semanas, o segundo teste de esforço foi realizado 48 horas após a última sessão de treinamento no mesmo horário habitual que os animais se exercitavam.

3.3. Eutanásia e retirada dos tecidos

Ao final do treinamento físico (24-48 horas) os animais foram eutanasiados por meio de inalação de isoflurano e a morte foi confirmada por deslocação cervical. Os músculos gastrocnêmio e sóleo foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos em ultra congelador (-80 °C) para análises futuras.

O cérebro foi retirado imediatamente após o sacrifício, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram dissecados para análises de consumo de oxigênio, atividade de citrato sintase, quantificação de RNA mensageiro (mRNA) e β -amilóide. Todas análises foram realizadas em hipocampo e córtex dos animais para que houvesse um tecido controle. Os animais 3xTG-AD apresentam marcadores característicos de AD (acúmulo de proteína β -amilóide e emaranhados neurofibrilares) no hipocampo ainda jovens, sendo que tais marcadores são apenas observados no córtex cerebral apenas em idades avançadas (MASTRANGELO e BOWERS, 2008; STERNICZUK e ANTLE e colab., 2010). Desta forma, a utilização do córtex pré-frontal foi feita com intuito de ter um tecido de referência para avaliação das variáveis estudadas.

3.4. Extração e quantificação de mRNA

Após retirada do tecido, o cérebro foi separado em hemisférios, sendo uma parte destinada para análise de mRNA. A extração foi realizada com método Trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Os pellets resultantes da extração foram ressuspensos em água livre de nucleotídeos e quantificados com o Espectrômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizada com 500ng de mRNA como template utilizando o *High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), de acordo com

as recomendações do fabricante. Para realização do experimento de quantificação de mRNA foram utilizados 500ng de cDNA. A quantificação de mRNA foi realizada utilizando *GoTaq[®] qPCR Master Mix kit* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) com o equipamento *StepOne Plus* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). As análises de quantificação foram feitas pelo método $\Delta\Delta C_t$ (Winer e colab., 1999), utilizando o gene GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) como referência.

Os genes analisados e suas sequências de primers são listados na tabela 1.

Tabela 1 - Genes e primers para RT-qPCR

Proteína	Gene	Primer <i>forward</i> (5'-3')	Primer <i>Reverse</i> (5'-3')
GAPDH	<i>Gapdh</i>	TTGGCATTGTGGAAGGG	GAGTTGCTGTTGAAGTCGC
PGC1 α	<i>Ppargc1a</i>	CAAGCCAAACCAACAAC TTTATCTCT	CACACTTAAGGTTTCGCTCAATAG T
PSEN1	Transgene <i>Psen1-3xTG</i>	AGGACTGACCACTCGAC CAG	CGGGGTCTAGTTCTGCAT
Controle 3xTG	Controle Positivo3xtg	CTAGGCCACAGAATTGA AAGATCT	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCAT CC
GLUT3	<i>Slc2a3</i>	CACCTGAGACAACGCAAC T	TCAGCATTTC AACAGACTCC
LDH-A	<i>Ldh-a</i>	TCGTGCACTAGCGGTCT CAA	TCCAAGCCACGTAGGTCAAG
MCT2 / EAAT2	<i>Slc16a7</i>	TCCAGTTCTTTTCGGCCC TC	GACTGTTCCGCTGGCTATGT
UCP5	<i>Slc25a14</i>	AACTGGCTTCGACTTGG AC	ATCAGGAACACAAAGAGGACC
BDNF	<i>Bdnf</i>	TGAAGTTGGCTTCCTAG CGG	CCTGGTGGAACTTCTTTGCG
NMDAR 2	<i>Grin2a</i>	TGGTGATCGTGCTGAAT AAGG	AGGTGACAATGCTGAGGTG
BDH1	<i>Bdh1</i>	CTAGGACAGGATTGGTG CTATG	GTGACCACCCTGAAGTCTATG

3.5. Detecção de β -amilóide

As amostras foram homogeneizadas em PBS acrescido de inibidores (Aprotinina -5 μ g/mL, PMSF [fluoreto de fenilmetilsulfonilo] - 1mM, Leupeptina - 1 μ g/mL, Ortovanadato de sódio - 10,28mM, Pirofosfato de sódio - 10,09mM, Fluoreto de sódio - 100mM), 10 μ l por mg de tecido. O *coating* dos poços foi realizado com a incubação overnight de 100 μ L do anticorpo de captura 6E10 (Biogen; 1:1000) diluído em PBS, em repouso e a 4°C. No dia seguinte, os poços foram lavados com 300 μ L de PBS por três vezes. Os poços foram submetidos à etapa de bloqueio com a adição de 200 μ L de solução de BSA (Sigma) / PBS 2%, mantida sob agitação constante durante 1 hora, em temperatura ambiente. Após o bloqueio, os poços foram novamente lavados com 300 μ L de PBS por três vezes. Procedeu-se então à etapa de adição de 100 μ L dos extratos (normalizados a 1,5 mg/mL de proteína total) nos poços, assim como a adição dos controles de A β O sintéticos, todos devidamente diluídos em BSA/PBS 2%. A incubação foi realizada sob agitação suave constante, *overnight* e a 4°C. No dia seguinte, os poços foram submetidos à lavagem com solução de Tween20/PBS 0,1% por três vezes. Foi realizada então a incubação com 100 μ L do anticorpo de detecção phage-bound NUsc1 (1:25), assim como o anticorpo controle 22:35 (Sigma-Aldrich; 1:1000), diluídos em BSA/PBS 2%. Os anticorpos de detecção foram incubados sob agitação constante durante uma hora em temperatura ambiente. Após a incubação com os anticorpos de detecção, os poços foram submetidos à lavagem com solução de Tween20/PBS 0,1% por três vezes. Procedeu-se então à etapa de adição dos anticorpos secundários conjugados com HRP, anti-M13-HRP (Sino Biological) e anti-rabbit IgG-HRP (GE Life Sciences). O volume de 100 μ L de ambos os anticorpos diluídos em BSA/PBS 2% na proporção de 1:5000 foi adicionado aos poços e incubado sob agitação constante durante uma hora em temperatura ambiente. Após a incubação com os anticorpos secundários conjugados, os poços foram submetidos à lavagem com solução de Tween20/PBS 0,1% por três vezes. O volume de 90 μ L da solução cromogênica de tetrametilbenzidina (TMB; Sigma) foi adicionado aos poços e incubado no escuro por aproximadamente 60 segundos (até o aparecimento da cor azul). A reação foi interrompida com a adição de 45 μ L de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5M. A densidade óptica

dos poços foi imediatamente lida em espectrofotômetro de placas (xMark™ BioRad), no comprimento de onda de 450 nm.

3.6. Consumo de oxigênio

As amostras de hipocampo e córtex foram lavadas em 1ml de tampão BIOPS (2,77 mM Ca²⁺-EGTA, 7,23 mM EGTA, 6,56 mM MgCl₂.6H₂O, 20 mM taurina, 15 mM fosfocreatina, 20 mM imidazol, 0,5 mM ditioneitol (DTT), 50 mM 2-[N-morfolina]-ácido etanosulfônico (KMES) e 5,77 mM ATP) para retirada de excesso de sangue e manutenção do tecido durante a dissecação.

Após a retirada das porções, as amostras foram colocadas em 5ml de meio de respiração mitocondrial (Mir 05 - 20 mM HEPES, 10 mM KH₂PO₄, 110 mM sacarose, 20 mM taurina, 60 mM K-lactobionato, 0.5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 1 g/L BSA livre de ácidos graxos, pH 7.1) e homogeneizadas delicadamente. Aliquotas de 2ml do homogenato foram adicionadas nas câmaras do equipamento de respirometria de alta resolução (*Oxygraph-2k, Oroboros Instruments™, Innsbruck, Austria*), a 37 °C com rotação de 300 rpm.

As velocidades de respiração foram obtidas na presença de substratos energéticos para o complexo I mitocondrial (10 mM glutamato + 5 mM malato). A capacidade fosforilativa (OXPHOS - P) foi determinada após a adição de ADP (0,2 mM), e a respiração não fosforilante (estado LEAK - L) foi obtida pelo bloqueio da ATP sintase com adição de oligomicina A (0,5 μM). A capacidade máxima respiratória (ETS – E) foi forçada por meio do desacoplador Carbonil cianeto m-clorofenilhidrazona (CCCP – 1 μM) e, por fim a respiração foi inibida com adição de antimicina A (1 μM) para determinação do consumo de O₂ residual (não relacionado ao metabolismo mitocondrial).

As razões entre os estados respiratórios foram utilizadas para avaliar aspectos mais específicos da bioenergética mitocondrial dentro de cada grupo. A capacidade fosforilativa em relação ao estado não-fosforilativo foi analisada por meio da razão entre OXPHOS e LEAK – P/L; o percentual de desacoplamento frente a capacidade fosforilativa foi observado por L/P; a razão P/E foi utilizada para obter a capacidade fosforilativa de reserva, relativa à respiração máxima; e o percentual de desacoplamento frente a capacidade

respiratória máxima foi analisado por meio da razão L/E. Para obtenção do consumo líquido de O₂ para fosforilação, realizamos a subtração OXPHOS – LEAK, e o percentual da respiração fosforilativa frente a máxima foi analisado pela razão (P-L)/E.

3.7. Atividade de citrato sintase

Para análise de citrato sintase (CS), 5ug de amostra (1ug/μl) foram adicionados em 200ul de tampão Tris-HCL (50mM – pH 7,0) + Triton-X (0,1%) e 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) - DTNB (100μM). O DTNB foi preparado fresco separadamente (1mM) e adicionado no tampão acima. Para reação, foi adicionado 2,5ul de Acetil CoA (5mM), a mesma foi disparada com a adição de 2,5ul de Oxaloacetato (25mM). Este protocolo foi adaptado para placa de 96 poços a partir do trabalho de Spinazzi et al (SPINAZZI e colab., 2012). A leitura foi realizada por 3 minutos em 412nm. Em caso de não saturação da curva, nova leitura era realizada por 5 minutos. A quantificação de enzima foi determinada pela fórmula abaixo. Os valores finais foram equalizados pela concentração de proteína das amostras.

$$\text{Unidades } (\mu\text{moles/min/ml}) = \frac{(\Delta A_{412}) / \text{min} \times V(\text{ml})}{\epsilon^{mM} \times L (\text{cm}) \times V_{enz} (\text{ml})}$$

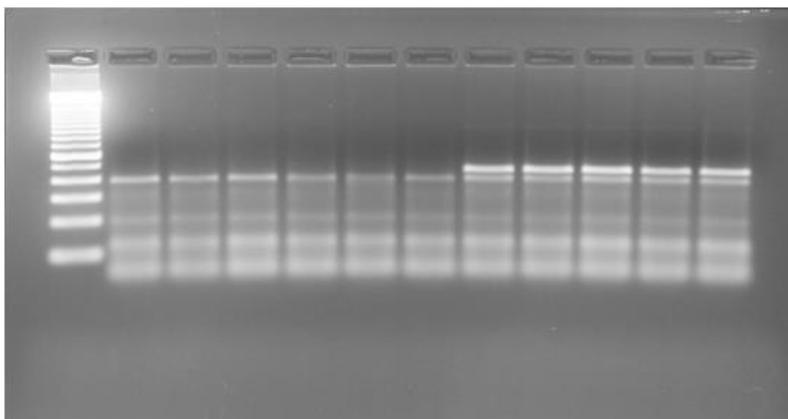
Sendo, $\Delta A_{412}/\text{min}$ = (Absorbância final – Absorbância inicial) / (tempo final – tempo inicial); $V(\text{mL})$ = Volume do teste: em placa de 96 poços (0,2mL); ϵ^{mM} = Coeficiente de extinção molar (13,6 mM⁻¹. cm⁻¹); L = Caminho ótico: em placa de 96 poços (0,552cm); V_{enz} = volume da amostra.

4. Resultados

4.1. Validação do modelo animal

A primeira etapa do trabalho foi a validação do modelo transgênico dos animais 3xTG-AD. Para tal fim, foram feitas análises de presença dos transgenes por meio de PCR (reação em cadeia de polimerase) convencional utilizando os primers fornecidos pelo laboratório responsável pela criação dos animais. Os animais controles apresentaram uma banda de 324 pb (pares de base) e os animais 3xTG-AD apresentaram 2 bandas (324 e 377 pb). Na figura 5 (A) é possível notar, nos poços 2-7, as bandas que representam animais C57BL/6;129; nos poços 8-12 há presença das bandas características dos animais 3xTG-AD. Na mesma figura (B) há presença de apenas um animal C57BL/6;129 apenas no último poço.

A



B

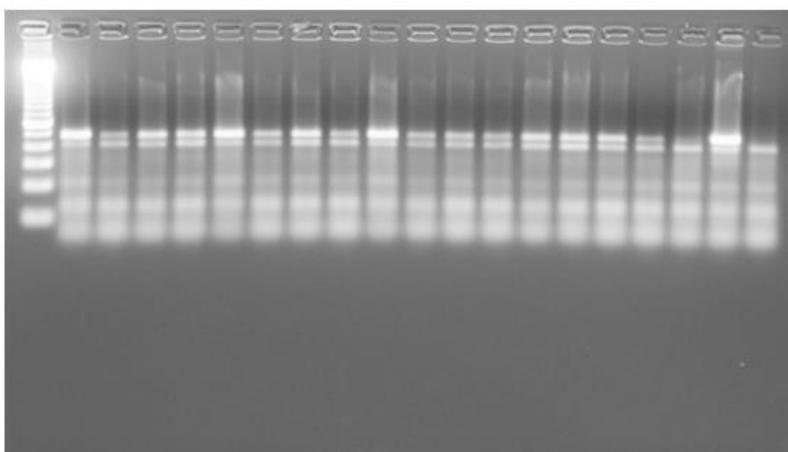


Figura 5 - Genotipagem dos animais WT e 3xTG-AD em gel de agarose 3%

Para confirmar a validade do modelo de DA, além da genotipagem foi realizada análise da presença de proteínas β -amilóide no hipocampo destes animais, por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

Foi possível observar a presença de proteína β -amilóide total e de oligômeros Nusc1, um fragmento de cadeia única tóxico, recentemente descoberto na DA (SEBOLLELA e colab., 2017). Os dados da figura 6 (A) representam as análises de β -amilóide total no hipocampo; e os dados no gráfico (B) são referentes às análises de oligômeros Nusc1 no mesmo tecido. Apenas os animais 3xTG-AD apresentaram níveis elevados destas duas formas de β -amilóide, confirmando o fenótipo da DA nos camundongos utilizados.

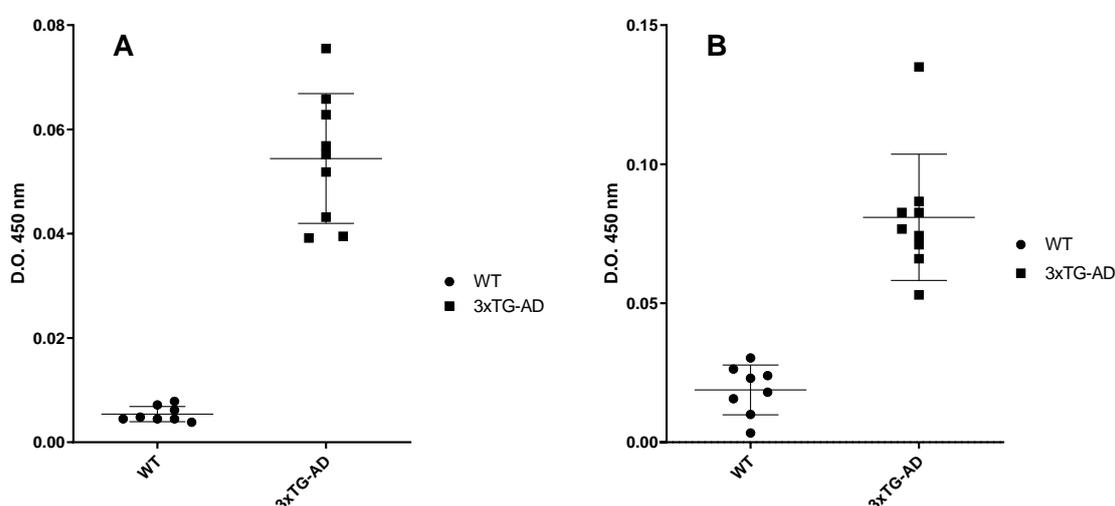


Figura 6 - Análise da presença de β -amilóide total e Nusc1 em hipocampo de animais WT e 3xTG-AD; D.O.= densidade óptica; n=9; dados expressos em média \pm desvio padrão.

4.2. Teste de treinamento e capacidade física

Os animais passaram por testes de capacidade física em esteira pré e pós protocolo de treinamento de 8 semanas. Como ilustrado na figura 7 (A) não houve diferença na capacidade física inicial dos animais WT quando comparados aos da cepa 3xTG-AD.

Após a divisão dos animais nos grupos controle, treinamento moderado e intenso, o teste de esforço foi refeito a fim de avaliar alterações na capacidade física dos camundongos. Os dados pré e pós treinamento, divididos pelos grupos e cepa, são mostrados na figura 7 (B).

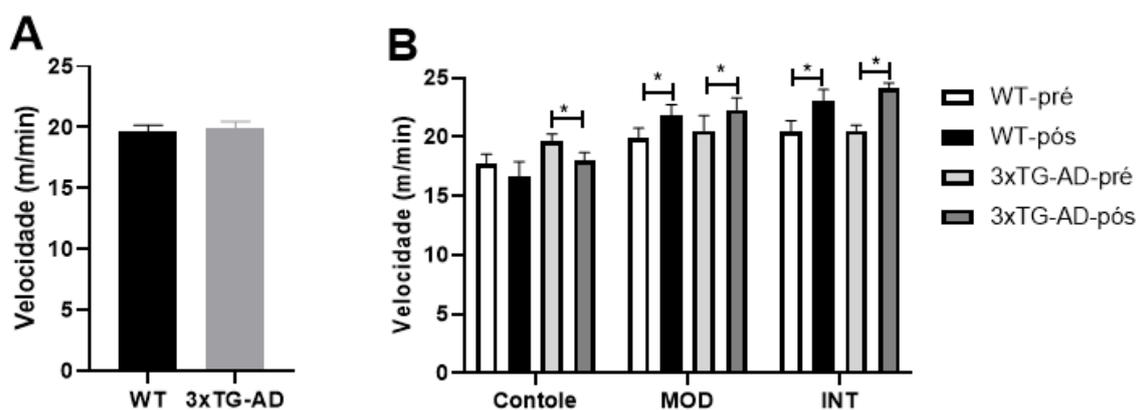


Figura 7 - Velocidade no teste de esforço em esteira; (A) dados gerais do teste pré treinamento físico; n=36 (B) velocidade pré e pós 8 semanas de treinamento físico de cada grupo; n=12; MOD: moderado; INT: intenso; Teste t pareado; *p<0.05; dados expressos em média \pm erro padrão.

Após 8 semanas de treinamento físico, animais WT e 3xTG-AD exibiram melhora na capacidade física em ambos os protocolos de treinamento, ao passo que os animais do grupo controle (que não realizaram treinamento) não demonstraram aumento na capacidade, mas sim uma ligeira queda. Os valores dos testes de esforço apontam para uma melhora na capacidade física dos animais. Para poder confirmar a efetividade dos treinamentos, foram realizadas análises de marcadores clássicos que sofrem influência do exercício em dois tecidos diferentes.

Para constatação de alterações fisiológicas dos animais frente ao treinamento, a expressão do gene BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) foi realizada no córtex (Figura 8).

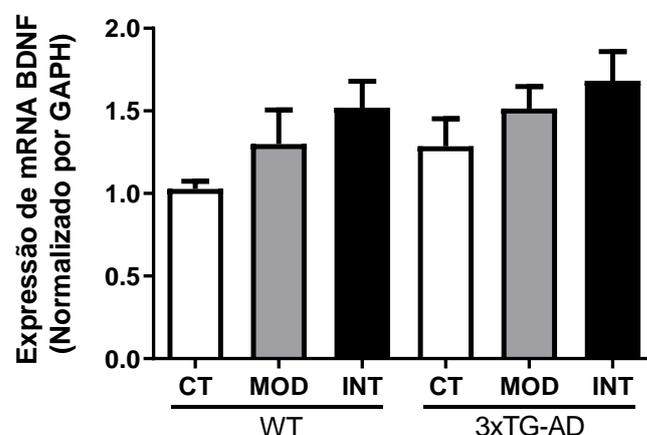


Figura 8 - Expressão de mRNA do gene BDNF no córtex pós treinamento físico; n=6; dados expressos em média \pm erro padrão.

O treinamento físico é reconhecido por elevar as concentrações deste gene em tecido cerebral, de forma intensidade-dependente (DE ALMEIDA e colab., 2013; SCHMOLESKY e colab., 2013), sendo utilizado para validar a efetividade do protocolo utilizado em causar alterações no cérebro dos camundongos. Em nosso estudo foi observada uma tendência ao aumento nos níveis de mRNA de BDNF no córtex dos animais, sendo mais proeminente no protocolo de treinamento intenso, sendo assim, o programa de exercício foi considerado efetivo, possibilitando sua aplicação para as análises futuras.

4.3. Atividade de citrato sintase

O conteúdo mitocondrial no hipocampo e córtex dos animais foi inferido por meio da atividade da citrato sintase. A atividade desta enzima se correlaciona fortemente com o número de mitocôndrias presentes no tecido e é um excelente indicador de conteúdo mitocondrial (REICHMANN e colab., 1985).

No córtex foi notada uma leve redução dos níveis de CS entre os grupos MOD e INT, sem diferença do controle (figura 9-A), enquanto no hipocampo (figura 9-B) houve uma queda dependente da intensidade no grupo WT. No grupo 3xTG-AD os animais que realizaram o treinamento moderado apresentaram uma redução na atividade quando comparados aos grupos CT e INT. Uma constatação interessante foi a diferença percebida entre os grupos controle dos animais WT e 3xTG-AD, sendo os valores da cepa com DA inferiores aos dos animais WT ($0,38 \pm 0,029$ e $0,47 \pm 0,017$, respectivamente), no hipocampo.

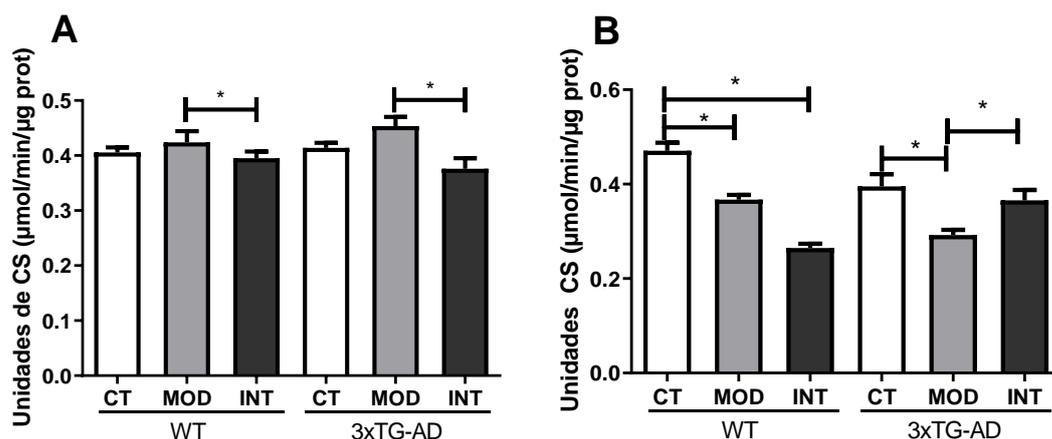


Figura 9 - Unidades de citrato sintase no (A) córtex pré-frontal e (B) hipocampo, após o protocolo de treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; $n=6$; dados expressos em média \pm erro padrão.

4.4. Consumo de oxigênio

4.4.1. Hipocampo

O tecido cerebral fresco foi utilizado para mensurar o consumo de oxigênio mitocondrial dos animais após o treinamento físico (24-48 horas). Os dados foram normalizados por concentração proteica da biópsia para avaliar a capacidade respiratória tecidual, ou pelo valor de atividade de CS de cada amostra, para que a respiração fosse indicativa da capacidade “por mitocôndria” e não do conteúdo mitocondrial total no tecido. As análises de respiração foram feitas nos mesmos animais das análises de atividade de CS, um hemisfério foi utilizado para respirometria e o outro para atividade enzimática.

Os resultados demonstraram que em animais WT, ambos os treinamentos não alteraram respiração tecidual quando comparados com o grupo controle, enquanto que em animais 3xTG os exercícios reduziram a capacidade respiratória quase em todos os estados (Figura 10), mais de forma significativa o MOD no estado OXPHOS (33,5%), e o INT nos estados LEAK e ETS (39% e 34%, respectivamente).

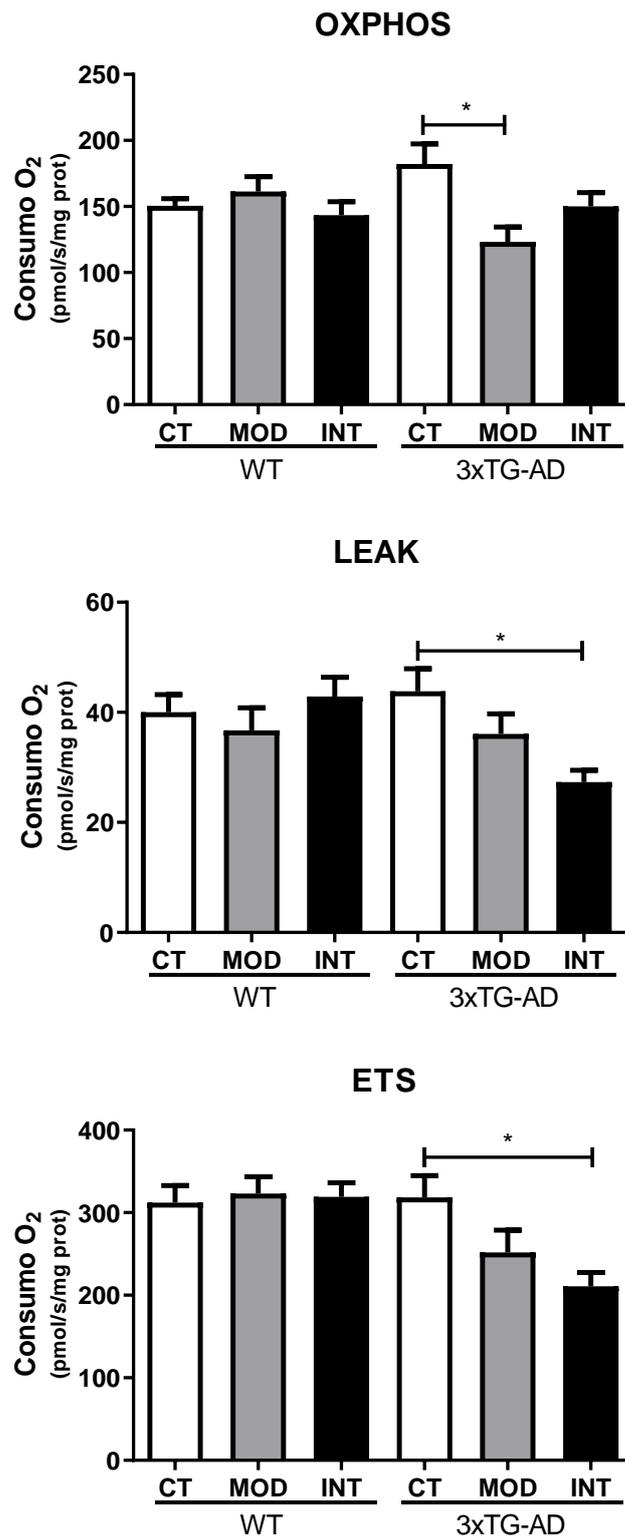


Figura 10: Respiração de hipocampo de animais WT e 3xTG-AD, normalizado por mg de proteína, após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; $n = 6$; dados normalizados por mg de proteína e expressos em média \pm erro padrão.

Normalizando essas taxas respiratórias pela atividade da CS (conteúdo mitocondrial) presente na biópsia, os resultados observados nos grupos WT e

3xTG-AD foram opostos. O efeito do treinamento nos animais C57BL/6;129 foi de elevação de todos os estados respiratórios quando comparados com o grupo controle. A capacidade fosforilativa (estado OXPHOS) teve um aumento de 37% no grupo MOD e 26% no INT (Figura 11-A). Esse aumento significativo no grupo MOD também foi observado pela elevada P-L (39,5%), calculada pela subtração da taxa não-fosforilativa (L) da taxa fosforilativa (P) (Figura 12-B); no desacoplamento (estado LEAK) a elevação foi de 09% e 49% no grupo MOD e INT, respectivamente (Figura 11-B), sendo que o aumento significativo no grupo INT também foi verificado pela elevada razão L/P (27%; Figura 12-A); e a capacidade máxima respiratória (estado ETS) do MOD foi 40% maior, enquanto do grupo INT teve um incremento de 54% (Figura 11-C). O controle (P-L)/E nesses grupos WT treinados foi diminuída (9,3% MOD e 30,2% INT; figura 12-C) demonstrando que essas mitocôndrias estão usando pouco de sua capacidade máxima respiratória para fosforilar o ADP.

Nos animais 3xTG-AD, que nas condições controle já tinham elevada capacidade respiratória mitocondrial, as alterações nos estados respiratórios promovidas pelo treinamento foram opostas aos WT. Foi notada uma redução na capacidade fosforilativa em 20% e 19% no treinamento moderado e intenso, respectivamente (Figura 10-A), e menores P-L (23% MOD e 12% INT; figura 12-B); o estado LEAK mostrou uma redução de 11% (MOD) e 43% (INT; figura 11-B), sendo que essa diminuição significativa no grupo INT também foi evidente pela baixa razão L/P (25% - figura 12-A); a capacidade máxima respiratória do grupo MOD reduziu 9%, enquanto o grupo INT teve uma redução de 37% (Figura 11-C). O controle (P-L)/E foi aumentado no grupo 3xTG treinados intensamente (37% - figura 12-C) demonstrando que essas mitocôndrias estão usando perto de sua capacidade máxima respiratória para fosforilar o ADP.

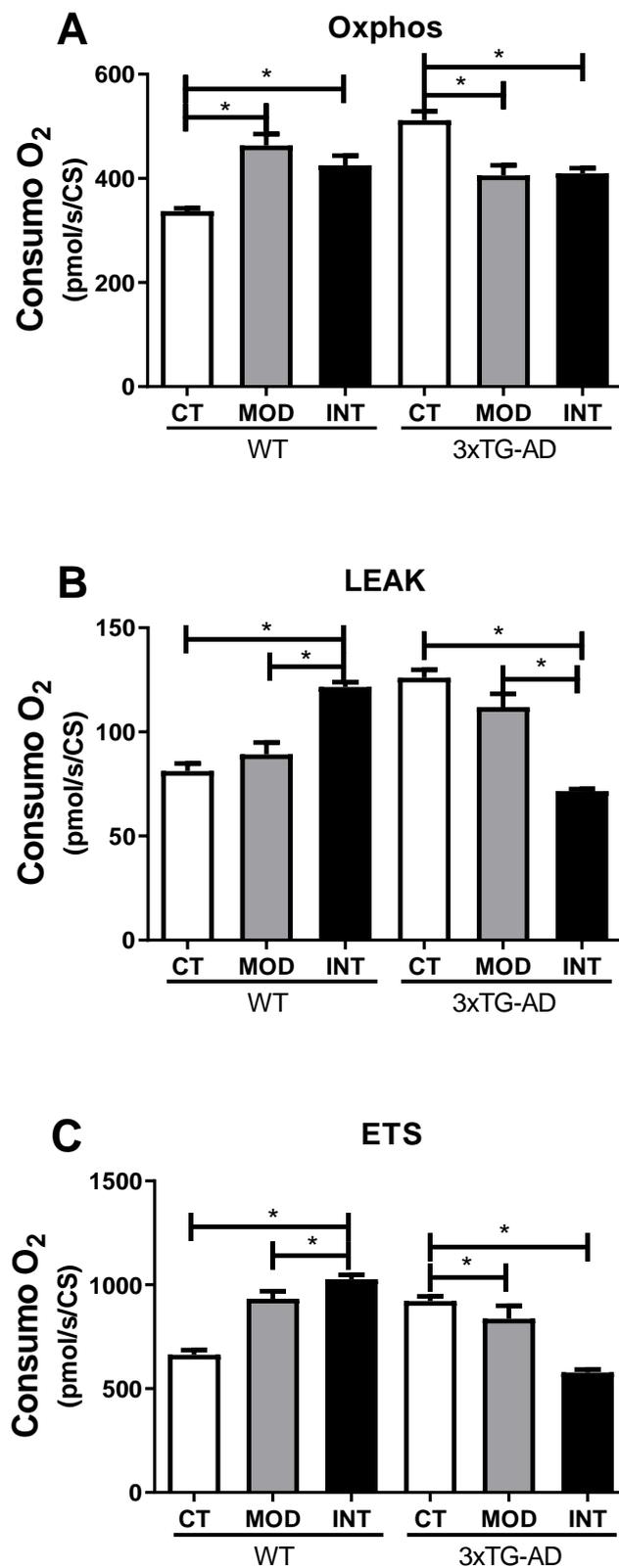
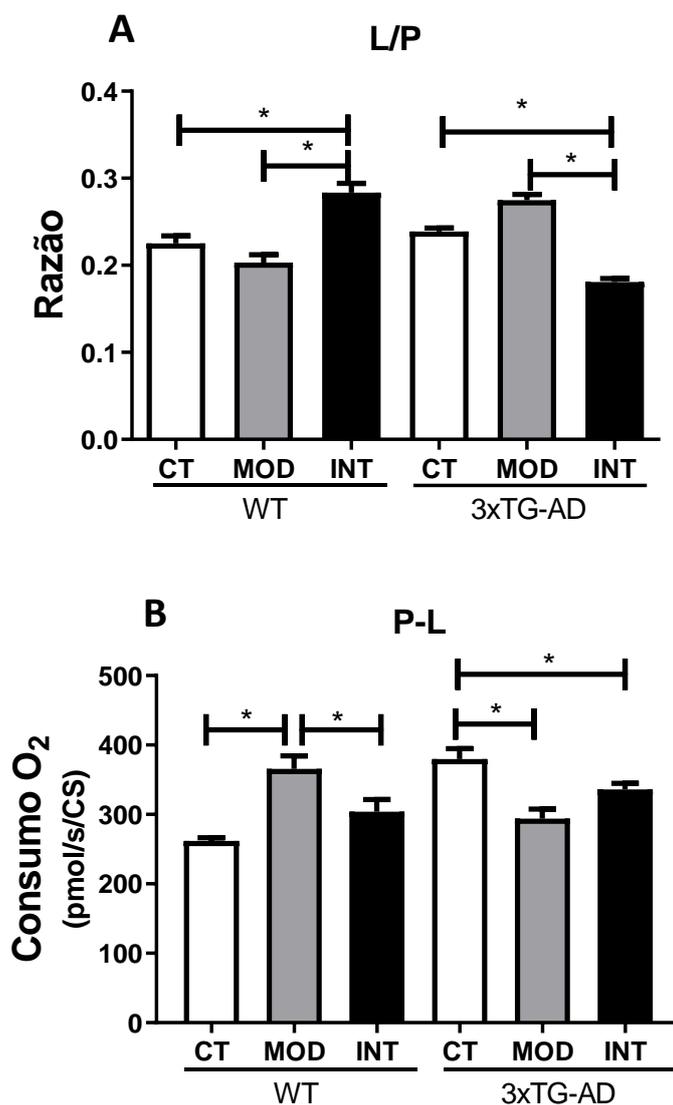


Figura 11: Respiração de hipocampo de animais WT e 3xTG-AD, normalizado por CS, após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; $n = 6$; dados expressos em média \pm erro padrão.

Em conjunto, esses resultados indicam que em hipocampus de animais WT, o treinamento diminui o conteúdo mitocondrial, porém aumenta sua capacidade fosforilativa, o que de forma geral mantém o fluxo respiratório do tecido. Por outro lado, em hipocampus de animais modelo para DA, as mitocôndrias possuem elevada capacidade respiratória, as quais são normalizadas pelos treinamentos. Isso, somado à redução no conteúdo mitocondrial leva a uma diminuição geral do fluxo respiratório do tecido.



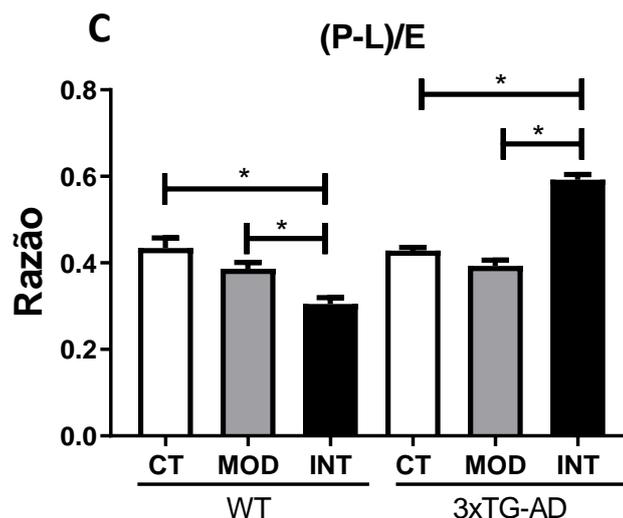
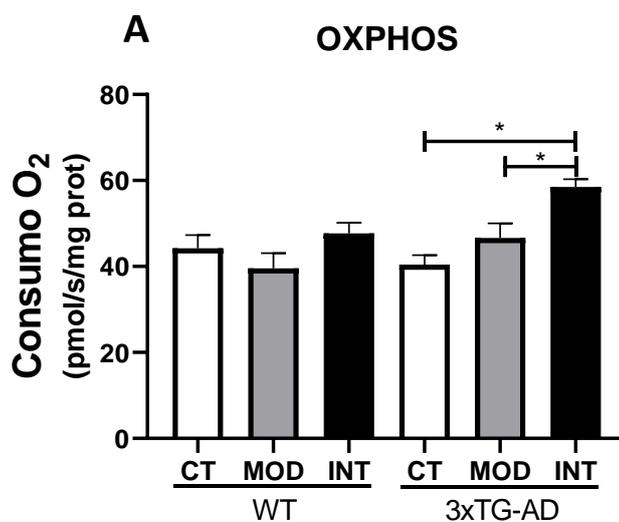


Figura 12: Razões entre os estados respiratórios no hipocampo, normalizados por CS. Animais WT e 3xTG-AD após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; $n = 6$; dados expressos em média \pm erro padrão.

4.5. Córtex pré-frontal

No córtex pré-frontal de animais WT, a análise de respiração tecidual demonstrou elevação apenas no estado LEAK (35%) do grupo INT (Figura 13-B), ao passo que elevação foram observadas nos estados “por mitocôndria” (normalizados por CS), na capacidade fosforilativa (32%; figura 14-A) e desacoplamento (108%; figura 14-B) apenas no grupo INT.



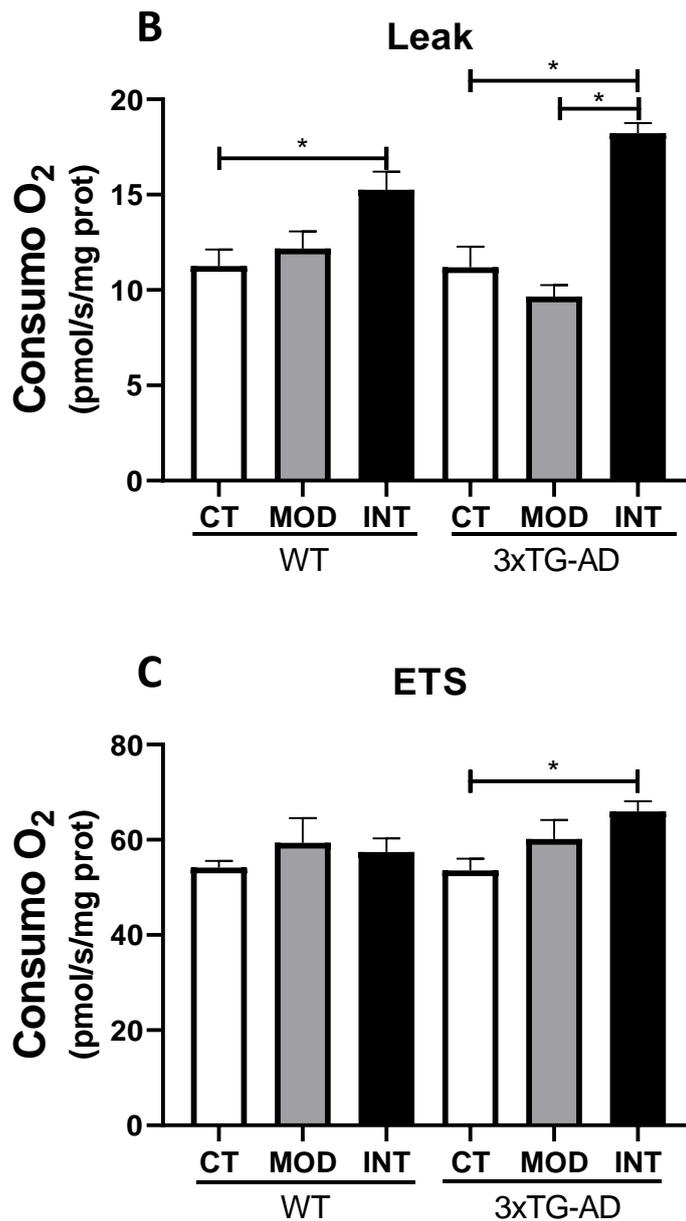


Figura 13: Respiração de córtex de animais WT e 3xTG-AD, normalizados por mg de proteína, após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; dados expressos em média \pm erro padrão.

Nota-se que a adaptação mais proeminente, em animais não doentes, foi causada pelo treinamento intenso, com principal desfecho sendo o aumento do desacoplamento mitocondrial de forma significativa tanto no tecido quando por conteúdo mitocondrial.

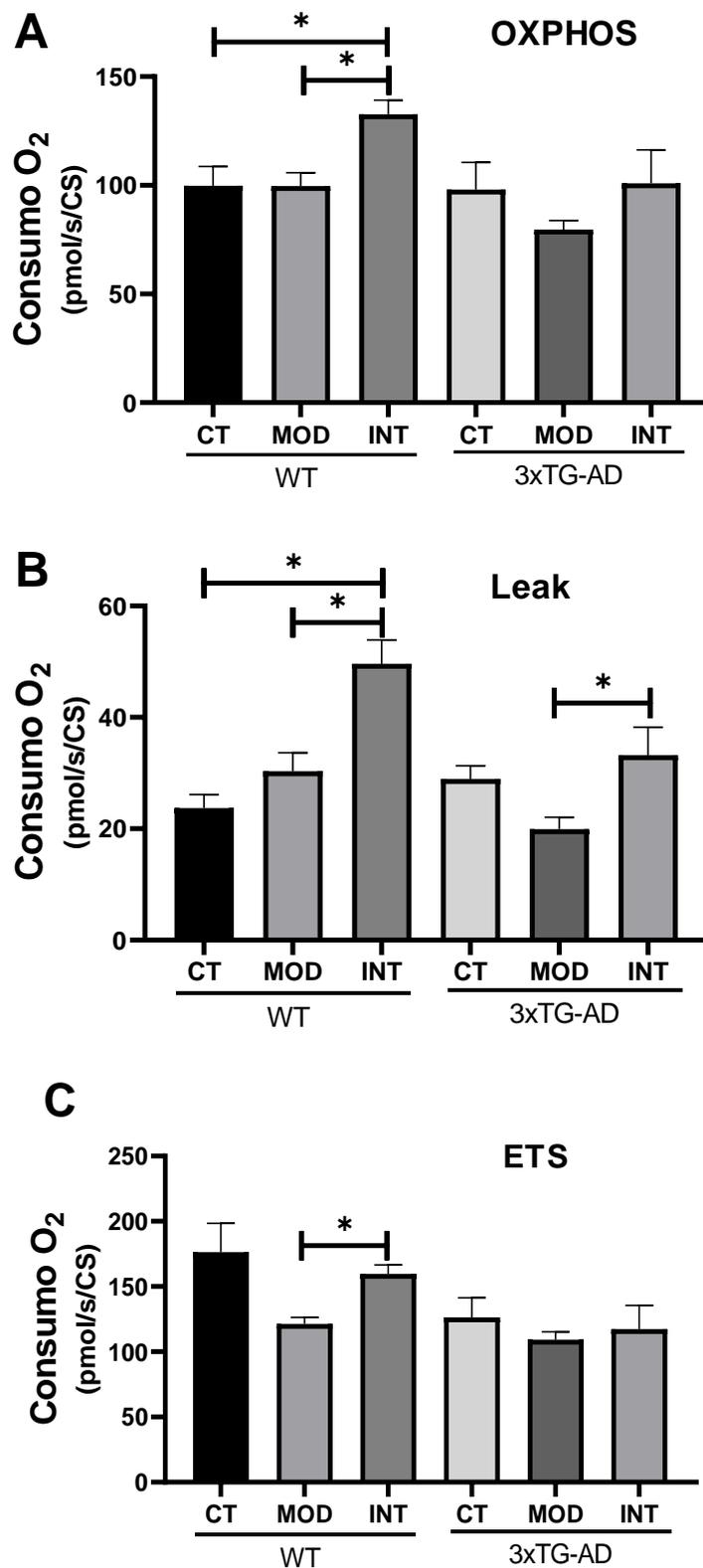


Figura 14: Respiração de córtex de animais WT e 3xTG-AD, normalizados por CS, após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; dados expressos em média \pm erro padrão.

Nos animais com DA, a análise de respiração por peso de tecido, apresentou elevações em todos os estados respiratórios apenas no grupo de treinamento intenso (Figura 13). De forma semelhante aos animais WT, o aumento de maior magnitude sendo no desacoplamento (63%; figura 13-B). As elevações nos demais estados foram de 44% e 23% em OXPHOS e ETS, respectivamente (Figura 13-A e C). Curiosamente, as análises normalizadas por conteúdo mitocondrial não demonstraram nenhuma alteração na respiração mitocondrial.

Apesar dos valores teciduais iniciais (grupos CT) semelhantes nos estados respiratórios de animais WT e 3xTG-AD, o exercício físico de alta intensidade gerou elevações no consumo de O₂ para fosforilação e capacidade máxima respiratória somente nos animais com DA.

A tabela 2 mostra os valores das razões entre os estados respiratórios no córtex dos animais ao final da intervenção com exercício físico. No grupos WT, similar aos dados do hipocampo, foi notada uma redução na relação entre OXPHOS e LEAK (P/L) com aumento no desacoplamento da respiração fosforilativa (L/P) e máxima (L/E), com o treinamento intenso. O aumento da razão P/E, nos grupos MOD e INT em conjunto com esses dados aponta para fosforilação mais próxima a capacidade respiratória máxima, sendo essa alteração a única observada nos animais 3xTG-AD do grupo INT. As análises de P-L e (P-L)/E não apresentaram alterações no córtex pré-frontal.

Tabela 2: Razões entre os estados respiratórios no córtex pré-frontal, normalizados por CS

RAZÃO	WT			3xTG-AD		
	CT	MOD	INT	CT	MOD	INT
P/L	4,10±1,26	3,32±0,97	2,75±0,46*	3,93±1,19	4,37±1,46	3,05±0,27
L/P	0,26±0,07	0,32±0,08	0,37±0,0,07*	0,28±0,08	0,26±0,13	0,33±0,03
P/E	0,69±0,1	0,82±0,07*	0,83±0,01*	0,77±0,06	0,73±0,07	0,86±0,01*#
L/E	0,19±0,07	0,26±0,07	0,30±0,05*	0,21±0,07	0,20±0,12	0,28±0,03

*Animais WT e 3xTG-AD após o treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; *p<0,05; n=6; dados expressos em média ± erro padrão; * = diferente do grupo CT da mesma cepa; # = diferente do grupo MOD da mesma cepa.*

Os dados dos animais com DA apontam para uma alteração na respiração tecidual significativa, oriunda de pequenas alterações em cada mitocôndria, de

forma a não alterar intensamente o funcionamento de cada organela, porém alterando o desfecho geral.

4.6. Efeito do exercício físico sobre marcadores da DA

Após as análises de CS e respiração, decidimos analisar a influência do exercício em um indicador de acúmulo de A β . Uma das alterações decorrentes da presença de níveis elevados de proteína amilóide e sua internalização celular é a redução nos níveis de receptor receptores glutamatérgicos N-metil D-aspartato (NMDA) (LIU, Pei-Pei e colab., 2019). Assim, realizamos a análise de expressão do gene *Grin2a*, responsável pela transcrição deste receptor em camundongos, no hipocampo dos animais.

A figura 12 mostra que os animais 3xTG-AD exibem menores níveis de expressão deste receptor, quando comparados com o grupo WT, possivelmente causado pelos maiores níveis de acúmulo de A β (como aponta a figura 6). Adicionalmente, o exercício físico moderado foi capaz de elevar esses níveis nos animais com DA.

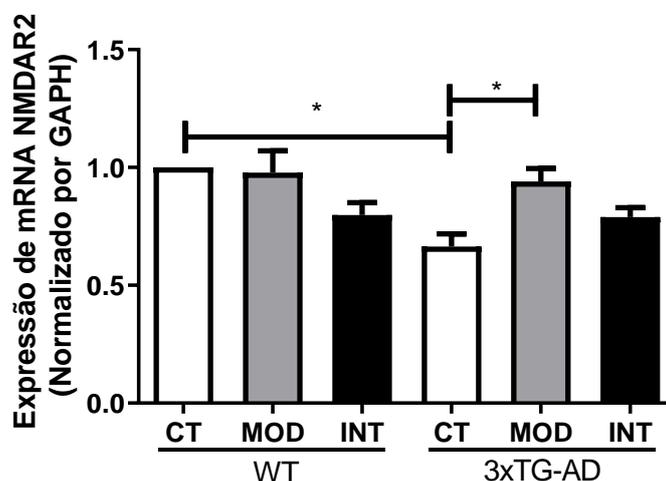


Figura 15: Expressão de mRNA de NMDAR2 no hipocampo após treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; dados expressos em média \pm erro padrão.

4.7. Efeito do exercício físico na reciclagem de A β

Os dados de expressão de NMDAR2, ilustrados na figura 12, apontaram para uma possível redução dos danos causados pelo acúmulo de proteína β -amilóide, deste modo realizamos a quantificação desta proteína nos diferentes grupos de treinamento para observar se o exercício físico foi capaz de reduzir sua concentração.

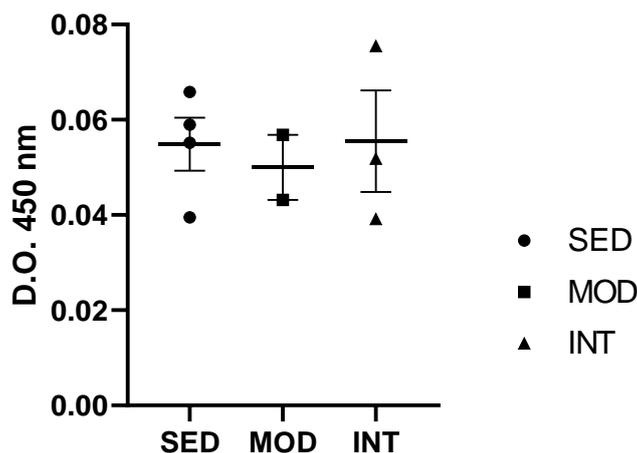


Figura 16: Acúmulo de A β no hipocampo de animais 3xTG-AD nos diferentes grupos de treinamento físico.

Apesar da capacidade do exercício físico em elevar os níveis de NMDAR2 em animais com DA, a concentração de proteína β -amilóide não foi reduzida após o treinamento. Esse evento pode se dar pelo fato de os animais 3xTG-AD terem uma capacidade muito alta de produção de A β devido às duas modificações genéticas.

4.8. Metabolismo energético

Buscando entender as alterações nos dados de respirometria discrepantes entre animais WT e 3xTG-AD, foram realizados experimentos de RT-qPCR (*Real time quantitative polymerase chain reaction*) em alguns genes responsáveis pelo metabolismo de glicose, lactato e corpos cetônicos em neurônios no hipocampo dos animais após a intervenção com exercício físico. Os genes analisados do metabolismo glicolítico e láctico foram GLUT3 (transportador de glicose; figura 17-A), LDH-A (lactato desidrogenase; figura 17-B) e MCT-2 (*monocarboxylate transporter* -transportador de lactato; figura 17-C).

Como mostrado na figura 17, animais 3xTG em condições controle possuem elevada expressão de LDH-A e reduzida de MCT-2 quando comparados aos WT. O treinamento físico em animais WT não alterou a expressão de GLUT3, porém o exercício INT significativamente aumentou a de LDH-A enquanto reduziu de forma sutil a expressão de MCT-2, indicando uma grande produção de lactato, proveniente da glicólise. Já em animais 3xTG, o treinamento aumentou de forma dependente da intensidade apenas na expressão de GLUT3, e aumentou ainda mais a de LDH-A e reduziu ainda mais a expressão de MCT-2 nos dois grupos de treinamento da cepa 3xTG-AD, indicando aumento do metabolismo glicolítico e de lactato.

Uma vez que o cérebro é capaz de utilizar corpos cetônicos como fonte de energia, analisamos a expressão do gene 3-hidroxiacetil-CoA desidrogenase tipo 1 (*bdh1*), codificador da enzima homônima que catalisa a conversão de β -hidroxiacetil-CoA à acetoacetato. Como mostra a figura 17-D, houve um aumento na concentração de mRNA deste gene após ambos treinamentos nos animais WT e diminuição nos animais 3xTG-AD.

Em conjunto, esses dados indicam que o treinamento induz os metabolismos glicolítico, láctico e de corpos cetônicos em neurônios de hipocampo saudáveis. Em animais modelo para a DA, o metabolismo glicolítico e láctico parecem estar mais ativos, no entanto o de corpos cetônicos não, talvez pelo metabolismo oxidativo mitocondrial estar reduzido nesses animais treinados.

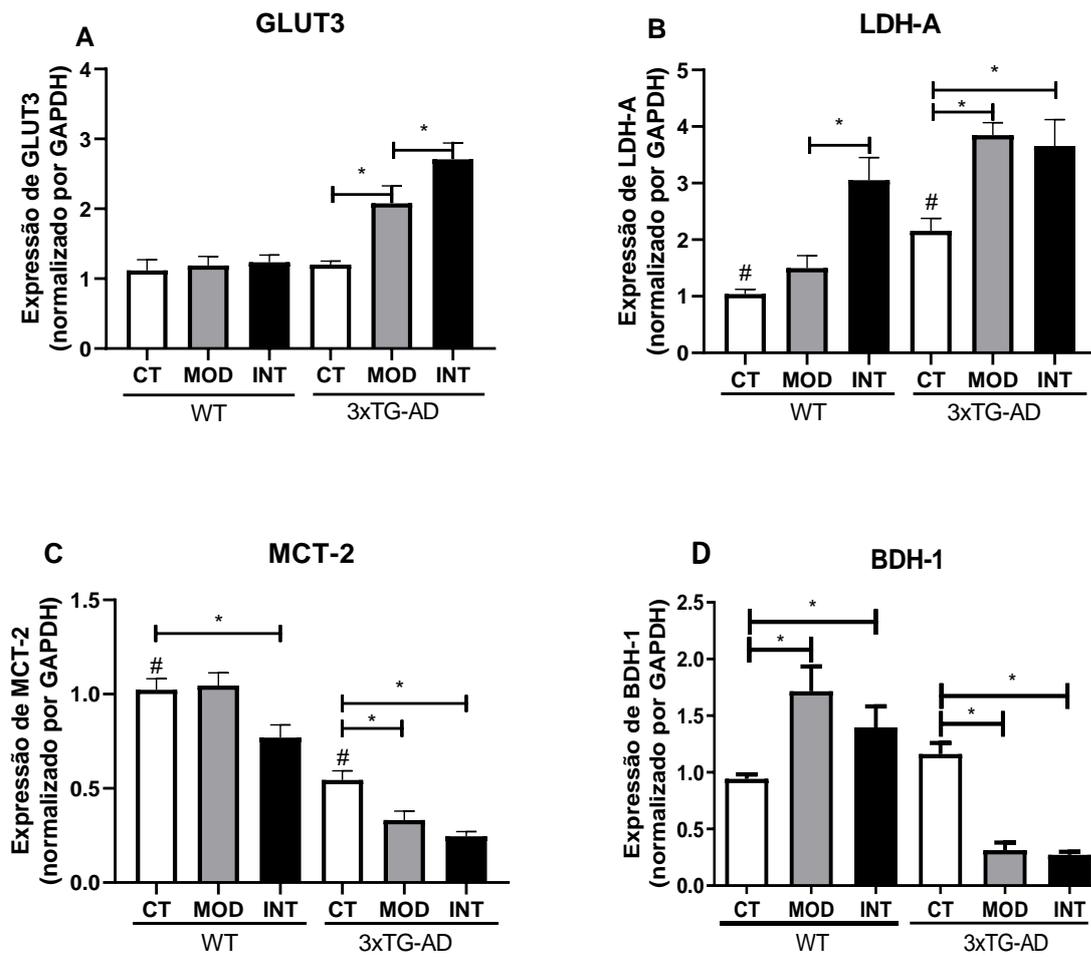


Figura 17: Expressão de genes da via glicolítica no hipocampo após treinamento físico; CT=controle; MOD=moderado; INT=intenso; Anova de uma via; * $p < 0,05$; $n = 6$; # = diferença entre os grupo CT de animais WT e 3xTG-AD; dados expressos em média \pm erro padrão.

5. Discussão

5.1. Protocolo de treinamento físico aeróbio

Na literatura existe um sem número de protocolos de exercício para animais, especialmente ratos e camundongos, sendo a maioria destes protocolos de treinamento aeróbio (DE MENDONÇA e colab., 2020; GHOLAMIAN e colab., 2020; LACERDA e colab., 2018). Para que o exercício possa ser controlado e seu estímulo ser equivalente para todos animais, é necessário que se mensure o esforço, o tempo de exposição e a frequência da atividade física. Assim, no presente trabalho foi adotado um protocolo de treinamento em esteira.

Para elaboração do protocolo, foi utilizado o método de treinamento criado por Wisloff et al. (WISLOFF e colab., 2001), em ratos sprang-dawley (reconhecidos por sua afinação ao exercício), que consiste em quatro estímulos de alta intensidade (75-90% da capacidade máxima respiratória – VO_2) com duração de oito minutos cada, intercalados por períodos de recuperação ativa à 50% do VO_2 máximo com duração de dois minutos. Ao adaptar este protocolo para humanos o mesmo grupo de estudo alterou o tempo de estímulo em alta intensidade para quatro minutos (TJØNNA e colab., 2008), uma vez que realizar oito minutos em intensidade tão alta como 90% do VO_2 máximo é extremamente difícil (se não impossível) para humanos não treinados, e o tempo de descanso ativo foi elevado para três minutos.

Em nosso trabalho, optamos por utilizar o protocolo aplicados em humanos, realizando ajustes para que os animais fossem capazes de cumpri-lo. O tempo de estímulo de alta intensidade foi reduzido para dois minutos, uma vez que os animais não eram capazes de sem manter na velocidade estipulada por mais que este tempo. Ao reduzir o tempo de estímulo, também reduzimos o tempo de descanso ativo para um minuto. O parâmetro de intensidade utilizado foi o de velocidade máxima obtida no teste de esforço, estipulando a zona de 70-75% da velocidade máxima como referência para o protocolo de alta intensidade. Este valor foi obtido por representar ~90% do VO_2 máximo (HØYDAL e colab., 2007).

Para o treinamento em intensidade moderada, utilizamos o protocolo clássico, preconizado pelo Colégio Americano de Medicina Desportiva (ACSM) de 30 minutos diários, em velocidade 50% equivalente ao teste de esforço (60-70% VO₂ máximo), totalizando 150 minutos semanais de atividade (PATE e colab., 1995).

A validação da efetividade dos protocolos de treinamento se deu por meio da análise da expressão do gene BDNF no cérebro dos animais, uma vez que foi demonstrado que a concentração deste fator neurotrófico se eleva em várias partes do sistema nervoso central, como hipocampo, córtex motor, córtex pré-frontal, septo lateral, cerebelo e amígdala (BERCHTOLD e colab., 2001; GUSTAFSSON e colab., 2011; KLINTSOVA e colab., 2004; KOO e colab., 2013; LIU, Yu-Fan e colab., 2009).

Em 2015, um trabalho avaliando os efeitos do treinamento em intensidade moderada e alta nos níveis de transcritos de BDNF no cérebro de ratos relatou um aumento mais pronunciado nos animais que realizaram o protocolo intenso (AFZALPOUR e colab., 2015). A intensidade de ambos os protocolos foram de 80% e 95% do VO₂ máximo, para o moderado e intenso, respectivamente. Apesar de mesmo o protocolo chamado pelo autor de moderado ser considerado por alguns de alta intensidade (moderado sendo usualmente utilizado até 70% VO₂ máximo), o aumento de expressão de BDNF foi de 100% para o grupo intenso e 58% no moderado, quando comparado com animais controle sedentários.

Utilizando de quatro protocolos de exercício físico, Jeon e colegas (JEON e HA, 2017) observaram elevações de BDNF no soro de humanos após um treinamento de seis semanas. Em uma abordagem mais conservadora, as faixas de VO₂ máximo de cada grupo eram de 40% (leve), 55% (moderado) e 70% (alta intensidade). Sendo que o grupo alocado como controle fez atividades de alongamento. Foi observado um aumento nos níveis de BDNF somente nos grupos que realizaram o treinamento moderado e de alta intensidade.

De forma geral, está bem estabelecido na literatura que os níveis de BDNF (transcrito ou sérico) podem ser utilizados para validar a efetividade de protocolos de treinamento de visam melhora no sistema nervoso. Assim como há marcadores aceitos para efetividade no sistema muscular (PCG-1 β e TFEB – *transcription factor of enhancement box*), BDNF é mais uma ferramenta no auxílio da determinação da intensidade de exercício físico em pesquisas (CEFIS

e colab., 2019; MANSUETO e colab., 2017; REYCRAFT e colab., 2020; SEIFERT e colab., 2009).

5.2. Metabolismo energético mitocondrial

O tecido cerebral tem alta demanda energética para manutenção de seu funcionamento (disparo de potencial de ação, neurotransmissão, entre outros fatores). De fato, na incapacidade de manter a oferta energética necessária, o metabolismo cerebral contribui para o declínio cognitivo (BIESSELS e KAPPELLE, 2005). De fato, estipula-se que 20% do consumo basal de oxigênio do corpo humano é destinado para produção de energia cerebral (GRIMM e ECKERT, 2017). Apesar de sua alta demanda energética, o cérebro utiliza apenas glicose, lactato e corpos cetônicos (quando em baixas concentrações de glicose) para seu funcionamento. Desta forma, a manutenção do conteúdo e qualidade mitocondrial são de suma importância em tratamento e prevenção de neuropatologias.

O exercício físico é reconhecido por estimular a biogênese mitocondrial em vários tecidos (GRANATA e colab., 2018; LIMA e colab., 2017), de fato, no cérebro pesquisas apontam para melhora na dinâmica, produção de energia e aumento de atividade enzimática mitocondrial (ALKADHI, 2018; GRIMM e ECKERT, 2017; GUSDON e colab., 2017).

Interessantemente, nosso trabalho não observou aumento no conteúdo mitocondrial, e sim redução, no hipocampo de animais saudáveis ou com DA (Figura 9-B). Entretanto, em animais WT, houve uma melhora na capacidade respiratória por mitocôndria, enquanto sua contraparte 3xTG-AD não apresentou tal desfecho. Em recente colaboração com nosso grupo, Singulani et al (SINGULANI e colab., 2020) observou redução gradativa de PGC-1 α no hipocampo de animais 3xTG, seguido de uma redução na atividade de complexos mitocondriais, o que pode explicar por que os hipocampus desses animais não apresentaram melhora na capacidade respiratória como observado nos WT.

Por mais que vários grupos tenham avaliado o efeito do exercício em variáveis mitocondriais no modelo triplo transgênico de DA, é difícil encontrar dados acerca de sua influência na respiração coordenada com o conteúdo, de

fato, em nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a realizar tal análise. Nossa constatação de redução no conteúdo mitocondrial (sem prejuízo na respiração) pode ser devido ao modelo utilizado. Os animais WT deste trabalho, são *background* do modelo 3xTG, podendo apresentar particularidades na resposta ao exercício ainda não elucidadas.

Com relação a influência do treinamento físico sobre a respiração mitocondrial neste modelo experimental, não conseguimos encontrar artigos para enriquecer esta discussão. Nossos resultados apontam que o treinamento diminui o conteúdo mitocondrial em hipocampos: em animais WT, essa redução é compensada por um aumento da capacidade respiratória mitocondrial, o que de forma geral mantém o fluxo respiratório do tecido; porém em modelo com DA, a capacidade mitocondrial que era elevada, foi reduzida com o treinamento ao nível dos camundongos WT controle, gerando um aspecto de normalização dos estados respiratórios que levou a uma diminuição geral do fluxo respiratório do tecido. Apesar disso, no grupo com DA a baixa razão L/P aponta uma redução no desacoplamento, indicando uma melhor eficiência na conversão de energia, o que pode garantir alguns ATPs a mais por O₂ consumido, e a (P-L)/E indica que a respiração fosforilativa está mais próxima da respiração máxima.

De forma geral, o processo de envelhecimento é marcado por uma redução na capacidade fosforilativa e respiratória máxima mitocondrial, sendo considerados fatores de aceleração da demência e doenças neurodegenerativas (LEUNER e colab., 2012). No presente trabalho, os animais WT apresentaram uma melhora nestes estados respiratórios no hipocampo, demonstrando uma melhora na capacidade mitocondrial frente ao exercício físico, tanto em intensidade moderada como alta. Apenas o protocolo de alta intensidade elevou o desacoplamento, algo reconhecido como característico do exercício (DIETRICH e colab., 2008), capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) por reduzir sutilmente o gradiente de prótons e acelerar a passagem dos elétrons pela cadeia respiratória, o que reduz o tempo em que o oxigênio molecular fica susceptível a redução monoelétrica e formação de EROS (SKULACHEV, 1998) .

Em contrapartida, os animais 3xTG, mesmo em idade jovem, apresentaram queda em OXPHOS e ETS, mostrando sinais de aceleração no processo de deficiência mitocondrial neste tecido. Uma vez que uma das

ferramentas utilizadas como forma de melhora no quadro de Alzheimer é a manutenção e melhora da biogênese e capacidade mitocondrial (SINGULANI e colab., 2020), porém, as alterações causadas pelo exercício não podem ser consideradas deletérias, uma vez que os valores reduziram para níveis próximos ao dos animais WT e as razões apontam para um melhor aproveitamento de O₂ para produção de energia.

No córtex pré-frontal, quase nenhuma alteração foi observada na respiração normalizada por conteúdo mitocondrial, nos animais 3xTG-AD, havendo uma leve diferença no estado LEAK entre os dois protocolos de treinamento, sem diferença quando comparado com o grupo controle. De fato, nenhuma alteração no desacoplamento foi observada na análise das razões entre os estados respiratórios. Em contrapartida, os animais WT apresentaram um aumento no consumo de oxigênio para fosforilação e desacoplamento (OXPHOS e LEAK – Figura 14-A e B). Os valores das razões respiratórias confirmam esse aumento no desacoplamento, com diminuição de P/L e aumento de L/P e L/E. Assim, o principal efeito do treinamento físico no córtex dos animais WT, foi a elevação no desacoplamento mitocondrial.

Ao analisar os valores dos estados respiratórios por miligramas de tecido, notou-se uma elevação OXPHOS, LEAK e ETS, de animais 3xTG-AD que realizaram treinamento de alta intensidade, ao passo que o grupo WT apresentou apenas aumento no desacoplamento. De fato, o exercício físico é reconhecido por elevar o desacoplamento mitocondrial no cérebro de animais sem patologias (DE OLIVEIRA BRISTOT e colab., 2019; MARQUES-ALEIXO e colab., 2012), porém, em nosso conhecimento, nosso trabalho é o primeiro a demonstrar esse efeito em animais com DA.

Contrastando estes dados de respiração normalizada por tecido e por conteúdo mitocondrial, no córtex pré-frontal após o treinamento intenso, notamos padrões muito distintos entre os animais com e sem DA. Em animais WT, ao analisarmos os estados respiratório por mitocôndrias, notamos aumentos em OXPHOS e LEAK, com as análises das razões confirmando elevação no desacoplamento, sendo este o único efeito visto na respiração normalizada por proteínas total no tecido. Em contrapartida, em animais 3xTG-AD, o efeito percebido foi oposto, sem alterações significativas nos estados respiratórios (e razões entre os estados) por mitocôndria, porém com elevações OXPHOS,

LEAK e ETS no tecido. Tal fenômeno pode ser devido a pequenas alterações em casa organela, gerando uma grande mudança respiração no tecido como um todo.

5.3. Exercício e proteína amilóide- β

O treinamento físico é tido como uma das formas de elevar capacidade de remoção de $A\beta$ em modelo de Alzheimer. De fato, o exercício voluntário foi capaz de reduzir a concentração de $A\beta$ extracelular em 40% no hipocampo de animais modelo para AD (ADLARD e colab., 2005). Dois pontos de divergência com nosso trabalho são o modelo animais e o tipo de exercício. O modelo TgCRND utilizado no trabalho de Adlard et al apresenta mutação apenas no gene da APP, elevando a expressão da proteína precursora de amilóide, mas não de outros fatores chaves para formação de $A\beta$ (como PS1, presente no modelo 3xTG-AD). Com relação ao protocolo de exercício físico, foi realizado exercício físico voluntário, em que rodas são introduzidas nas caixas dos animais para que eles façam sua atividade de forma livre e espontânea, com duração de 5 meses.

Estudos utilizando exercício em esteira foram capazes de avaliar redução nas concentrações de $A\beta$ em animais com AD. Utilizando modelo transgênico APP/PS1, expostos a 5 meses de treinamento em esteira, Liu et al observou redução na formação de $A\beta$ no hipocampo dos animais (LIU, Hui-Li e colab., 2013). Em sua intervenção, os animais realizavam treinamento em esteira 5 vezes por semana em velocidade entre 8 e 11 m/min. Além do modelo animal diferente do usado em nosso trabalho, o estudo de Liu também não mostrou tanto rigor no exercício, uma vez que não houve teste de esforço nem controle individual da velocidade. Adicionalmente, o tempo de treinamento foi maior. Pode-se especular que após meses de intervenção, a capacidade física dos animais elevou-se, tornando o exercício que poderia ser de intensidade moderada em seu período inicial, se torna-se leve para os animais, algo que seria mais próximo da intensidade de um exercício voluntário.

Em uma análise do efeito do exercício físico por 4 semanas, em ratos Wistar injetados com peptídeos $A\beta$, Khodadadi et al (KHODADADI e colab., 2018) observaram redução de aproximadamente 25% em placas senis

marcadas com tioflavina-S. De forma semelhante aos demais artigos citados, não houve controle rigoroso do protocolo de treinamento, sendo os animais treinado 5 vezes por dia em duas sessões separadas, com velocidade de máxima de 15 m/m, considerada entre leve e moderada para ratos Wistar. O modelo de injeção de A β também é uma diferença significativa do modelo transgênico, uma vez que a injeção se deu apenas uma vez, ao passo que os animais 3xTG-AD apresentam uma constante síntese deste peptídeo.

Ainda faltam dados sobre os efeitos das diferentes intensidades de exercício físico na redução da formação e remoção de A β . Os trabalhos disponíveis até o momento apontam para uma melhora nesses parâmetros em protocolos de longo prazo (5+ meses) em intensidade leve-moderada ou em exercício voluntário.

5.4. Análise de genes da via glicolítica

A fim de entender as alterações energéticas no hipocampo dos animais, realizamos a análise de expressão de genes da via glicolítica, uma vez que essa é a principal via de obtenção de energia no tecido cerebral (MAGISTRETTI e ALLAMAN, 2013).

Existe uma fina interação energética entre neurônios e astrócitos para manutenção do metabolismo cerebral. Como ilustrado na figura 5, a glicose tem duas vias de entrar no cérebro, sendo por GLUT1 (astrócitos) e GLUT3 (neurônios). Os astrócitos, providos de poucas mitocôndrias convertem rapidamente a glicose em lactato e o exportam via MCT1 para os neurônios. A importação de lactato pelos neurônios é feita pela isoforma 2 do transportador de monocarboxilato (MCT2). O lactato é rapidamente convertido em piruvato via LDHA (LDH1 em humanos), o qual é transportado para mitocôndria onde sofre descarboxilação oxidativa, nutrindo o ciclo de Krebs e a respiração mitocondrial. Existe uma discussão acerca da capacidade dos neurônios de realizar glicólise (BREKKE e colab., 2015; HERRERO-MENDEZ e colab., 2009), porém nossos dados, apontam para o fato de neurônios serem capazes de utilizar este substrato para geração de energia e são corroborados por trabalhos que demonstraram que a estimulação neural eleva o consumo de glicose sem

aumento na utilização de O_2 , ou seja, gerando energia por meio de glicólise (DÍAZ-GARCÍA e colab., 2017; FOX e colab., 1988).

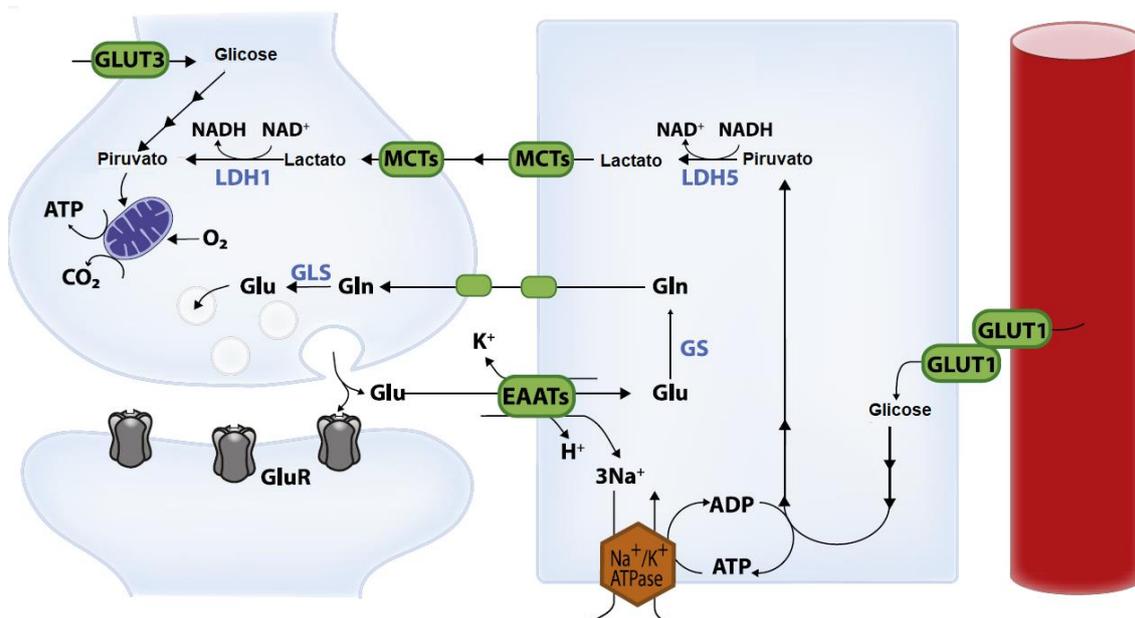


Figura 18: Interação astrócito-neurônio no metabolismo energético e sináptico de humanos.

Em animais WT que realizaram o exercício moderado houve aumento somente na expressão de BDH, demonstrando uma maior capacidade de utilização de corpos cetônicos-. Alinhando esses dados com os resultados mitocondriais, a redução no conteúdo mitocondrial pode ter sido compensada pela elevação na capacidade fosforilativa, sendo capaz de elevar a produção de ATP sem aumento na importação e conversão de lactato, em parte por utilização de corpos cetônicos para obtenção de energia. Em contrapartida, nos animais que realizaram atividade intensa, houve uma ligeira redução no importador de lactato (MCT-2) com aumento expressivo na LDH-A e BDH-1. Com aumento na capacidade de utilização de lactato, somado a capacidade de metabolizar corpos cetônicos, é possível que a necessidade de importação de lactato tenha sido sutilmente reduzida. Como demonstrado por Lu, et al, (LU e colab., 2015) há uma correlação direta entre a concentração intracelular de lactato e a expressão de MCT-2, assim, ao se metabolizar mais rapidamente este substrato, sendo suficiente para geração de energia (com auxílio de utilização de corpos cetônicos), seus níveis podem ser reduzidos, bem como sua importação.

Em condição controle (sedentário) animais 3xTG-AD exibiram metabolismo alterado: menor expressão de MCT-2, maior expressão de LDH-A e similar de BDH-1, mesmo com conteúdo mitocondrial similar. Interessantemente, a capacidade respiratória mitocondrial deste grupo foi acima dos animais WT, demonstrando um perfil parecido ao causado pelo exercício em animais WT, exceto pelo desacoplamento mais alto. Após os protocolos de exercício, os animais com DA demonstraram um forte aumento da expressão de GLUT3, indicando uma possível elevação na glicólise. Adicionalmente, houve uma redução ainda maior da expressão de MCT-2, com aumento da expressão de LDH-A e forte redução da expressão de BDH-1. Em conjunto, esses dados apontam para um aumento no metabolismo glicolítico e láctico animais treinados modelo para a DA, assim como verificado em WT, no entanto nesses animais o metabolismo de corpos cetônicos não parece estar estimulado, talvez pelo metabolismo oxidativo mitocondrial estar reduzido, ou ainda, uma vez que a entrada de corpos cetônicos nos neurônios é por meio do mesmo transportador de lactato (MCT-2) (JENSEN e colab., 2020), a redução observada na expressão deste transportador pode ter levado à redução extremamente similar nos níveis de mRNA de BDH-1. Para suprir então as necessidades energéticas celulares, temos um aumento substancial do transportador GLUT3 para a importação de glicose.

Outra possibilidade é de que o aumento na expressão do gene LDH-A, possa ser uma forma de tentar manter a utilização de lactato por meio de um maior número desta enzima, visto que um dos efeitos da DA (e outras doenças neurodegenerativas é a redução na atividade da piruvato desidrogenase (PDH) com consequente elevação de LDH, a fim de elevar a glicólise no tecido, uma vez que a geração de energia aeróbia está prejudicada (KUMAR JHA e colab., 2012). Adicionalmente, foi demonstrado que a superexpressão de LDH e PDH é capaz de reduzir os danos causados por A β em cultura de células, reduzindo a respiração mitocondrial sem perda nas concentrações de ATP (NEWINGTON e colab., 2012). De fato, é possível notar que os animais 3xTG-AD apresentam maior expressão deste gene do que os animais WT, na condição sedentária. Uma vez que e a demanda energética dos animais 3xTG-AD pode não estar sendo suficiente pelo metabolismo de lactato (visto sua possível redução na

atividade de PDH) e mitocondrial, pode ocorrer um aumento na importação de glicose para obtenção de energia via glicólise, com concomitante redução na utilização de corpos cetônicos. Adicionalmente, essa elevação nos níveis de LDH-A podem ser uma forma de diminuir os danos causados pelo acúmulo de A β . Sendo esses efeitos potencializados pelo exercício físico.

6. Conclusão

Os dados apresentados neste trabalho levam a conclusão de que o exercício físico de moderada e alta intensidade, realizado por 8 semanas é capaz de alterar a capacidade aeróbia de animais da cepa 3xTG. Em contrapartida, o treinamento físico não foi capaz de reduzir as concentrações de proteína β -amilóide em hipocampus deste modelo.

Em hipocampus saudáveis, os protocolos de exercício físico reduzem o conteúdo mitocondrial, porém aumentam a capacidade respiratória por mitocôndria, o que mantém os níveis de respiração tecidual. Ainda, principalmente o exercício intenso, induz a expressão de genes que indicam incremento dos metabolismos láctico e de corpos cetônicos de neurônios. Em animais modelo para a DA, que já demonstram elevado metabolismo glicolítico e láctico na condição sedentária, os protocolos de exercício físico reduzem o conteúdo mitocondrial, porém não aumentam a capacidade respiratória por mitocôndria, o que reduz os níveis de respiração tecidual. Ainda, principalmente os exercícios intensos induzem a expressão de genes que indicam incremento dos metabolismos glicolítico e láctico de neurônios, no entanto não os de corpos cetônicos, talvez pelo metabolismo oxidativo mitocondrial ou o transporte de lactato/corpos cetônicos estar reduzido nesses animais treinados. Adicionalmente, o treinamento físico eleva a expressão de LDH-A, tido como gene importante na redução de danos causados por acúmulo de A β .

Mais trabalhos são necessários para constatarem o efeito do treinamento físico na cepa 3xTG-AD no metabolismo mitocondrial do cérebro, uma vez que a literatura ainda é escassa nesta área.

7. Sugestões para trabalhos futuros

Estudos futuros acerca da influência do exercício no metabolismo mitocondrial do cérebro de animais 3xTG-AD devem contemplar variáveis como marcadores de estresse oxidativo, testes de memória, utilização de substrato energético e comparação entre diferentes modelos de treinamento (voluntário X forçado). Desta forma, será possível entender de forma mais profunda as implicações do treinamento neste modelo animal.

8. Referências

ADLARD, Paul A e colab. **Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease.** The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, v. 25, n. 17, p. 4217–4221, Abr 2005.

AFZALPOUR, Mohammad Esmail e colab. **Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain.** Physiology & Behavior, v. 147, p. 78–83, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938415002073>>.

ALKADHI, Karim A. **Exercise as a Positive Modulator of Brain Function.** Molecular Neurobiology, v. 55, n. 4, p. 3112–3130, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12035-017-0516-4>>.

ANDERS, J M. **The Rôle of Physical Exercise in the Open-air in the Prophylaxis of Tuberculosis.** Transactions of the American Climatological Association for the year ... American Climatological Association, v. 29, p. 145–155, 1913. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21408591>>.

BERCHTOLD, N C e colab. **Estrogen and exercise interact to regulate brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein expression in the hippocampus.** The European journal of neuroscience, v. 14, n. 12, p. 1992–2002, Dez 2001.

BERENJEIAN TABRIZI, Hossein e colab. **The Effect of High-Intensity Interval Training on Mitochondrial Biogenesis of Lung Tissue TT - برنامه دوره یک تأثیر - ریه بافت میتوکندریایی بایوژنز بر شدید تناوبی تمرین** JFUMS, v. 6, n. 4, p. 522–529, 1 Feb 2017. Disponível em: <<http://journal.fums.ac.ir/article-1-1211-en.html>>.

BIESSELS, G J e KAPPELLE, L J. **Increased risk of Alzheimer's disease in Type II diabetes: insulin resistance of the brain or insulin-induced amyloid pathology?** Biochemical Society transactions, v. 33, n. Pt 5, p. 1041–1044, Nov 2005.

BO, Hai e colab. **Exercise-Induced Neuroprotection of Hippocampus in APP/PS1 Transgenic Mice via Upregulation of Mitochondrial 8-Oxoguanine DNA Glycosylase.** Oxidative medicine and cellular longevity, v. 2014, p. 834502, 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4236906&tool=pmc>>

entrez&rendertype=abstract>.

BOULGHOBRA, Doria e colab. **Exercise training protects the heart against ischemia-reperfusion injury: A central role for mitochondria?** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 152, p. 395–410, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584920304147>>.

BRAAK, H e BRAAK, E. **Neuropathological staging of Alzheimer-related changes.** *Acta Neuropathologica*, v. 82, n. 4, p. 239–259, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF00308809>>.

BREKKE, Eva e MORKEN, Tora Sund e SONNEWALD, Ursula. **Glucose metabolism and astrocyte–neuron interactions in the neonatal brain.** *Neurochemistry International*, v. 82, p. 33–41, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018615000224>>.

CARLSTRÖM, C O. **The Treatment of Heart Disease by Therapeutic Gymnastics.** *American Physical Education Review*, v. 15, n. 7, p. 508–514, 1 Out 1910. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/23267224.1910.10650276>>.

CASS, Shane P. **Alzheimer’s Disease and Exercise: A Literature Review.** *Current Sports Medicine Reports*, v. 16, n. 1, 2017. Disponível em: <https://journals.lww.com/acsm-csmr/Fulltext/2017/01000/Alzheimer_s_Disease_and_Exercise__A_Literature.9.aspx>.

CEFIS, Marina e colab. **The effect of exercise on memory and BDNF signaling is dependent on intensity.** *Brain Structure and Function*, v. 224, n. 6, p. 1975–1985, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00429-019-01889-7>>.

CHEN, Wei-Wei e ZHANG, Xia e HUANG, Wen-Juan. **Role of physical exercise in Alzheimer’s disease.** *Biomedical reports*, v. 4, n. 4, p. 403–407, Abr 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27073621>>.

CHEN, Yanxing e colab. **A Non-transgenic Mouse Model (icv-STZ Mouse) of Alzheimer’s Disease: Similarities to and Differences from the Transgenic Model (3xTg-AD Mouse).** *Molecular Neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 711–725, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12035-012-8375-5>>.

CUMMINGS, Jeffrey L e VINTERS, Harry V e COLE, Gregory M. **Alzheimer’s disease: Etiologies, pathophysiology, cognitive reserve, and treatment opportunities.** 2012.

- DE ALMEIDA, Alexandre Aparecido e colab. **Differential effects of exercise intensities in hippocampal BDNF, inflammatory cytokines and cell proliferation in rats during the postnatal brain development.** *Neuroscience Letters*, v. 553, p. 1–6, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394013007489>>.
- DE BRUIJN, Renée F A G e IKRAM, M Arfan. **Cardiovascular risk factors and future risk of Alzheimer's disease.** *BMC Medicine*, v. 12, n. 1, p. 130, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12916-014-0130-5>>.
- DE MENDONÇA, Mariana e colab. **Aerobic exercise training regulates serum extracellular vesicle miRNAs linked to obesity to promote their beneficial effects in mice.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 319, n. 3, p. E579–E591, 3 Ago 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00172.2020>>.
- DE OLIVEIRA BRISTOT, Viviane José e colab. **The Role of PGC-1 α /UCP2 Signaling in the Beneficial Effects of Physical Exercise on the Brain** . *Frontiers in Neuroscience* . [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.00292>>. , 2019
- DÍAZ-GARCÍA, Carlos Manlio e colab. **Neuronal Stimulation Triggers Neuronal Glycolysis and Not Lactate Uptake.** *Cell Metabolism*, v. 26, n. 2, p. 361- 374.e4, 2017.
- DIETRICH, Marcelo O e ANDREWS, Zane B e HORVATH, Tamas L. **Exercise-Induced Synaptogenesis in the Hippocampus Is Dependent on UCP2-Regulated Mitochondrial Adaptation.** *The Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 42, p. 10766 LP – 10771, 15 Out 2008. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/content/28/42/10766.abstract>>.
- E, Lezi e BURNS, Jeffrey M. e SWERDLOW, Russell H. **Effect of high-intensity exercise on aged mouse brain mitochondria, neurogenesis, and inflammation.** *Neurobiology of Aging*, v. 35, n. 11, p. 2574–2583, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.033>>.
- EDSON, Bini. *Dialogos I - Platão*. Dialogos I - Platão. 1. ed. [S.l.]: edipro, 2013. p. 59.
- FANG, Evandro F e colab. **Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease.** *Nature neuroscience*, v. 22, n. 3, p. 401–412, Mar 2019.

FERGUSON, Lee H. **Tuberculosis and Physical Activity**. The Journal of Health and Physical Education, v. 5, n. 8, p. 7–46, 1 Out 1934. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/23267240.1934.10620788>>.

FOLCH, J. e colab. **Review of the advances in treatment for Alzheimer disease: strategies for combating β -amyloid protein**. Neurología (English Edition). [S.l.: s.n.], 2018

FOX, P T e colab. **Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity**. Science (New York, N.Y.), v. 241, n. 4864, p. 462–464, Jul 1988.

GARCÍA-MESA, Yoelvis e colab. **Oxidative Stress Is a Central Target for Physical Exercise Neuroprotection Against Pathological Brain Aging**. The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences, v. 71, n. 1, p. 40–49, Jan 2016.

GATZ, Margaret e colab. **Heritability for Alzheimer's disease: The study of dementia in Swedish twins**. Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences, v. 52, n. 2, p. 117–125, 1997.

GATZ, Margaret e colab. **Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease**. Archives of General Psychiatry, v. 63, n. 2, p. 168–174, 2006.

GHOLAMIAN, Samira e colab. **The effects of interval aerobic training on mesenchymal biomarker gene expression, the rate of tumor volume, and cachexia in mice with breast cancer**. Iranian journal of basic medical sciences, v. 23, n. 2, p. 244–250, Fev 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32405368>>.

GIMÉNEZ-LLORT, Lydia e colab. **Gender-Specific Neuroimmunoendocrine Response to Treadmill Exercise in 3xTg-AD Mice**. International journal of Alzheimer's disease, v. 2010, p. 128354, 12 Out 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20981262>>.

GOEDERT, M e colab. **Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease**. Neuron, v. 3, n. 4, p. 519–526, Out 1989.

GOEDERT, Michel e SPILLANTINI, Maria Grazia. **Propagation of Tau aggregates**. Molecular Brain, v. 10, n. 1, p. 18, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13041-017-0298-7>>.

- GRANATA, Cesare e JAMNICK, Nicholas A e BISHOP, David J. **Principles of Exercise Prescription, and How They Influence Exercise-Induced Changes of Transcription Factors and Other Regulators of Mitochondrial Biogenesis.** *Sports Medicine*, v. 48, n. 7, p. 1541–1559, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40279-018-0894-4>>.
- GRIMM, Amandine e ECKERT, Anne. **Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view.** *Journal of Neurochemistry*, v. 143, n. 4, p. 418–431, 1 Nov 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jnc.14037>>.
- GUSDON, Aaron M e colab. **Exercise increases mitochondrial complex I activity and DRP1 expression in the brains of aged mice.** *Experimental Gerontology*, v. 90, p. 1–13, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556516305058>>.
- GUSTAFSSON, Sofia e LIANG, Wen e HILKE, Susanne. **Effects of voluntary running in the female mice lateral septum on BDNF and corticotropin-releasing factor receptor 2.** *International journal of peptides*, v. 2011, p. 932361, 2011.
- HAASS, Christian e colab. **Trafficking and Proteolytic Processing of APP.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10.1101/cshperspect.a006270, v. 2, n. 5, 1 Maio 2012. Disponível em: <<http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/5/a006270.abstract>>.
- HALL, Alicia M e ROBERSON, Erik D. **Mouse models of Alzheimer's disease.** *Brain Research Bulletin*, v. 88, n. 1, p. 3–12, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923011003546>>.
- HAMPEL, Harald e colab. **The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease.** *Brain*, v. 141, n. 7, p. 1917–1933, 1 Jul 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/brain/awy132>>.
- HARDY, John A e HIGGINS, Gerald A. **Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis.** *Science*, v. 256, p. 184+, 7 Maio 1992.
- HARRIS, J. **Physical exercise in heart disease.** *The Lancet*, 1921.
- HASEGAWA, Masato. **Molecular Mechanisms in the Pathogenesis of Alzheimer's disease and Tauopathies-Prion-Like Seeded Aggregation and Phosphorylation.** *Biomolecules*. [S.l: s.n.], 2016
- HEBERT, L E e colab. **Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population.** *JAMA*, v. 273, n. 17, p. 1354–1359, Maio 1995.

HERRERO-MENDEZ, Angel e colab. **The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C–Cdh1**. *Nature Cell Biology*, v. 11, n. 6, p. 747–752, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ncb1881>>.

HERRUP, Karl. **Reimagining Alzheimer's disease - An age-based hypothesis**. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 50, p. 16755–16762, 2010.

HOLMSTRÖM, Kira M e FINKEL, Toren. **Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling**. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 15, n. 6, p. 411–421, Jun 2014.

HØYDAL, Morten A. e colab. **Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: Practical implications for exercise training**. *European Journal of Preventive Cardiology*, v. 14, n. 6, p. 753–760, 2007.

INTERNATIONAL, Alzheimer Disease. **Custo atual e futuro e prevalência da doença de Alzheimer e outras demências**. p. 11–19, 2013. Disponível em: <bupa.com/dementia alz.co.uk>.

INTERNATIONAL, Alzheimer Disease. **World Alzheimer Report 2010: the global economic impact of dementia**. London: [s.n.], 2014.

JENSEN, Nicole Jacqueline e colab. **Effects of ketone bodies on brain metabolism and function in neurodegenerative diseases**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 22, p. 1–17, 2020.

JEON, Yong Kyun e HA, Chang Ho. **The effect of exercise intensity on brain derived neurotrophic factor and memory in adolescents**. *Environmental Health and Preventive Medicine*, v. 22, n. 1, p. 27, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12199-017-0643-6>>.

KAMETANI, Fuyuki e HASEGAWA, Masato. **Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease**. *Frontiers in Neuroscience*. [S.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00025>>. , 2018

KERR, Jesse S e colab. **Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms**. *Trends in neurosciences*, v. 40, n. 3, p. 151–166, Mar 2017.

KESTENBAUM, Bryan e colab. **Impaired skeletal muscle mitochondrial bioenergetics and physical performance in chronic kidney disease**. *JCI insight*, v. 5, n. 5, p. e133289, 12 Mar 2020. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32161192>>.

KHODADADI, Davar e colab. **Treadmill Exercise Ameliorates Spatial Learning and Memory Deficits Through Improving the Clearance of Peripheral and Central Amyloid-Beta Levels.** *Neurochemical Research*, v. 43, n. 8, p. 1561–1574, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2571-2>>.

KLINTSOVA, Anna Y e colab. **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, Nov 2004.

KOO, Jung Hoon e colab. **Neuroprotective effects of treadmill exercise on BDNF and PI3-K/Akt signaling pathway in the cortex of transgenic mice model of Alzheimer's disease.** *Journal of exercise nutrition & biochemistry*, v. 17, n. 4, p. 151–160, Dez 2013.

KUMAR, Anil e SINGH, Arti e EKAVALI. **A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: An update.** *Pharmacological Reports*, v. 67, n. 2, p. 195–203, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>>.

KUMAR JHA, Mithilesh e JEON, Sangmin e SUK, Kyoungho. **Pyruvate Dehydrogenase Kinases in the Nervous System: Their Principal Functions in Neuronal-glia Metabolic Interaction and Neuro-metabolic Disorders.** *Current Neuropharmacology*, v. 10, n. 4, p. 393–403, 2012.

KURZ, Alexander e PERNECZKY, Robert. **Novel insights for the treatment of Alzheimer's disease.** *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 35, n. 2, p. 373–379, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278584610002812>>.

KWAK, Y-S e colab. **Effect of regular exercise on senile dementia patients.** *International journal of sports medicine*, v. 29, n. 6, p. 471–474, Jun 2008.

LACERDA, Débora Romualdo e colab. **Aerobic training reduces immune cell recruitment and cytokine levels in adipose tissue in obese mice.** *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, v. 44, n. 5, p. 512–520, 10 Out 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1139/apnm-2018-0523>>.

LEHNINGER, T. M. e NELSON, D. L. e COX, M. M. **Princípios de bioquímica.** 6. ed. [S.l.]: Artmed, 2014.

LEUNER, Kristina e MÜLLER, Walter E e REICHERT, Andreas S. **From**

Mitochondrial Dysfunction to Amyloid Beta Formation: Novel Insights into the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, v. 46, n. 1, p. 186–193, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12035-012-8307-4>>.

LIMA, Tanes I e colab. **Role of microRNAs on the Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Insulin Signaling in Skeletal Muscle.** *Journal of Cellular Physiology*, v. 232, n. 5, p. 958–966, 1 Maio 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jcp.25645>>.

LIU, Hui-li e colab. **Long-term treadmill exercise inhibits the progression of Alzheimer's disease-like neuropathology in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice.** *Behavioural Brain Research*, v. 256, p. 261–272, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432813004841>>.

LIU, Pei-Pei e colab. **History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 4, n. 1, p. 29, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41392-019-0063-8>>.

LIU, Yu-Fan e colab. **Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I.** *The Journal of physiology*, v. 587, n. Pt 13, p. 3221–3231, Jul 2009.

LOURENCO, Mychael V e colab. **Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models.** *Nature Medicine*, v. 25, n. 1, p. 165–175, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0275-4>>.

LU, Weitian e colab. **Changes in lactate content and monocarboxylate transporter 2 expression in A β 25-35-treated rat model of Alzheimer's disease.** *Neurological Sciences*, v. 36, n. 6, p. 871–876, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10072-015-2087-3>>.

MACMAHON, C. **Breathing and physical exercises for use in cases of wounds in the pleura, lung and diaphragm.** *The Lancet*, 1915.

MAGISTRETTI, Pierre J e ALLAMAN, Igor. *Brain Energy Metabolism BT - Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical.* PFAFF, D. W. (Org.). . New York, NY: Springer New York, 2013. p. 1591–1620. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1997-6_56>.

MANSUETO, Gelsomina e colab. **Transcription Factor EB Controls Metabolic**

- Flexibility during Exercise.** Cell metabolism, v. 25, n. 1, p. 182–196, Jan 2017.
- MARQUES-ALEIXO, Inês e colab. **Physical exercise as a possible strategy for brain protection: Evidence from mitochondrial-mediated mechanisms.** Progress in Neurobiology, v. 99, n. 2, p. 149–162, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008212001347>>.
- MASTRANGELO, Michael A e BOWERS, William J. **Detailed immunohistochemical characterization of temporal and spatial progression of Alzheimer’s disease-related pathologies in male triple-transgenic mice.** BMC neuroscience, v. 9, p. 81, Ago 2008.
- MATILAINEN, Olli e QUIRÓS, Pedro M e AUWERX, Johan. **Mitochondria and Epigenetics - Crosstalk in Homeostasis and Stress.** Trends in cell biology, v. 27, n. 6, p. 453–463, Jun 2017.
- MEESE, A H. **MUSIC, PHYSICAL EXERCISE AND RECREATION IN MENTAL DISEASES.** American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation, v. 9, n. 1, 1930. Disponível em: <https://journals.lww.com/ajpmr/Fulltext/1930/02000/MUSIC,_PHYSICAL_EXERCISE_AND_RECREATION_IN_MENTAL.4.aspx>.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes - Terapêuticas Doença de Alzheimer.** . [S.l.: s.n.], 2013. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/02/pcdt-doenca-de-alzheimer-livro-2013.pdf>>.
- MIRMIRAN, M e colab. Chapter 28 Environmental influences on brain and behavior in aging and Alzheimer’s disease. SWAAB, D. F. e colab. (Org.). . Aging of the Brain and Alzheimer’s Disease. [S.l.]: Elsevier, 1986. v. 70. p. 443–459. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308643216>>.
- MUCKE, Lennart e SELKOE, Dennis J. **Neurotoxicity of amyloid β -protein: Synaptic and network dysfunction.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 2, n. 7, p. 1–18, 2012.
- NEWINGTON, Jordan T e colab. **Overexpression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1 and Lactate Dehydrogenase A in Nerve Cells Confers Resistance to Amyloid β and Other Toxins by Decreasing Mitochondrial Respiration and Reactive Oxygen Species Production***,. Journal of Biological Chemistry, v. 287, n. 44, p. 37245–37258, 2012. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820625236>>.

ODDO, Salvatore e colab. **Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction.** *Neuron*, v. 39, n. 3, p. 409–421, Jul 2003.

PALANDI, Juliete e colab. **Neuropathic pain after spinal cord injury and physical exercise in animal models: A systematic review and meta-analysis.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 108, p. 781–795, 2020. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763419303203>>.

PATE, Russell R e colab. **Physical Activity and Public Health: A Recommendation From the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine.** *JAMA*, v. 273, n. 5, p. 402–407, 1 Fev 1995. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1001/jama.1995.03520290054029>>.

PICCA, Anna e colab. **Targeting mitochondrial quality control for treating sarcopenia: lessons from physical exercise.** *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 23, n. 2, p. 153–160, 1 Fev 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1559827>>.

POSSE, Baroness Rose. **How Physical Training Affects the Welfare of the Nation.** *American Physical Education Review*, v. 15, n. 7, p. 493–499, 1 Out 1910. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/23267224.1910.10650274>>.

RAY, Paul D e HUANG, Bo-Wen e TSUJI, Yoshiaki. **Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling.** *Cellular signalling*, v. 24, n. 5, p. 981–990, Maio 2012.

REICHMANN, H e colab. **Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits.** *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, v. 404, n. 1, p. 1–9, Maio 1985.

REYCRAFT, Joshua T e colab. **Exercise Intensity and Recovery on Circulating Brain-derived Neurotrophic Factor.** *Medicine and science in sports and exercise*, v. 52, n. 5, p. 1210–1217, 2020. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/31815833>>.

SCHMOLESKY, Matthew T e WEBB, David L e HANSEN, Rodney A. **The effects of aerobic exercise intensity and duration on levels of brain-derived neurotrophic factor in healthy men.** *Journal of sports science & medicine*, v.

12, n. 3, p. 502–511, 1 Set 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24149158>>.

SEBOLLELA, Adriano e colab. **A human scFv antibody that targets and neutralizes high molecular weight pathogenic amyloid- β oligomers.** *Journal of neurochemistry*, v. 142, n. 6, p. 934–947, Set 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28670737>>.

SEIFERT, Thomas e colab. **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, 18 Nov 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00525.2009>>.

SHI, Yang e colab. **ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy.** *Nature*, v. 549, n. 7673, p. 523–527, Set 2017.

SIMS, Rebecca e HILL, Matthew e WILLIAMS, Julie. **The multiplex model of the genetics of Alzheimer's disease.** *Nature Neuroscience*, v. 23, n. 3, p. 311–322, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41593-020-0599-5>>.

SINGULANI, Monique Patricio e colab. **Impairment of PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis precedes mitochondrial dysfunction and Alzheimer's pathology in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease.** *Experimental Gerontology*, v. 133, p. 110882, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556519306734>>.

SKULACHEV, Vladimir P. **Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1363, n. 2, p. 100–124, 1998.

SMITH, A e BRANDT, S. **Physical Activity: A Tool in Promoting Mental Health****No Title.** *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services*, v. 17, n. 11, p. 24–25, 1979.

SNEVE, HALDOR. **GYMNASTICS AND MASSAGE IN THE TREATMENT OF NERVOUS DISEASES.** *Journal of the American Medical Association*, v. 55, n. 4, p. 297–301, 23 Jul 1910. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jama.1910.04330040033011>>.

SOARES, Nayron Medeiros e colab. **Impacto econômico e prevalência da doença de Alzheimer em uma capital Brasileira Economic impact and prevalence of Alzheimer's disease in a Brazilian capital.** v. 10, n. 3, p. 133–

138, 2017.

SPINAZZI, Marco e colab. **Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells.** Nature Protocols, 2012.

STERNICZUK, Roxanne e DYCK, Richard H e colab. **Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 1. Circadian changes.** Brain Research, v. 1348, p. 139–148, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899310010929>>.

STERNICZUK, Roxanne e ANTLE, Michael C e colab. **Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: Part 2. Behavioral and cognitive changes.** Brain Research, v. 1348, p. 149–155, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899310013466>>.

STEVANOVIĆ, Jelena e colab. **Physical exercise and liver “fitness”: Role of mitochondrial function and epigenetics-related mechanisms in non-alcoholic fatty liver disease.** Molecular Metabolism, v. 32, p. 1–14, 2020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212877819309470>>.

STOVER, Kurt R e colab. **Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease.** Behavioural Brain Research, v. 289, p. 29–38, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432815002545>>.

SWERDLOW, Russell H e KHAN, Shaharyar M. **A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease.** Medical hypotheses, v. 63, n. 1, p. 8–20, 2004.

TAKAHASHI, Muneaki e colab. **Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau.** Acta Neuropathologica, v. 129, n. 6, p. 895–907, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1415-2>>.

TJØNNA, Arnt Erik e colab. **Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: A pilot study.** Circulation, v. 118, n. 4, p. 346–354, 2008.

TREWIN, Adam J. e colab. **Acute exercise alters skeletal muscle mitochondrial respiration and H₂O₂ emission in response to hyperinsulinemic-euglycemic clamp in middle-aged obese men.** PLoS ONE, v. 12, n. 11, p. 1–18, 2017.

TREWIN, Adam J. e BERRY, Brandon J. e WOJTOVICH, Andrew P. **Exercise and mitochondrial dynamics: Keeping in shape with ROS and AMPK.** *Antioxidants*, v. 7, n. 1, 2018.

UM, Hyun-Sub e colab. **Treadmill exercise represses neuronal cell death in an aged transgenic mouse model of Alzheimer's disease.** *Neuroscience research*, v. 69, n. 2, p. 161–173, Fev 2011.

VIDONI, Eric D e colab. **Aerobic Exercise Sustains Performance of Instrumental Activities of Daily Living in Early-Stage Alzheimer Disease.** *Journal of geriatric physical therapy* (2001), v. 42, n. 3, p. E129–E134, 2019.

WANG, Qin e colab. **Voluntary exercise counteracts A β 25-35-induced memory impairment in mice.** *Behavioural brain research*, v. 256, p. 618–625, Nov 2013.

WHITE, PAUL D. **THE TREATMENT OF HEART DISEASE OTHER THAN BY DRUGS.** *Journal of the American Medical Association*, v. 89, n. 6, p. 436–439, 6 Ago 1927. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jama.1927.02690060016006>>.

WILKINS, Heather M e colab. **Oxaloacetate activates brain mitochondrial biogenesis, enhances the insulin pathway, reduces inflammation and stimulates neurogenesis.** *Human molecular genetics*, v. 23, n. 24, p. 6528–6541, Dez 2014.

WIMO, A e JONSSON, L e WINBLAD, B. **An Estimate of the Worldwide Prevalence and Direct Costs of Dementia in 2003.** *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, v. 21, n. 3, p. 175–181, 2006. Disponível em: <<https://www.karger.com/DOI/10.1159/000090733>>.

WIMO, Anders e colab. **The worldwide economic impact of dementia 2010.** *Alzheimer's & Dementia*, v. 9, n. 1, p. 1- 11.e3, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1552526012025307>>.

WINER, J e colab. **Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro.** *Analytical biochemistry*, v. 270, n. 1, p. 41–49, 1999.

WINGO, Thomas S e colab. **Autosomal recessive causes likely in early-onset Alzheimer disease.** *Archives of neurology*, v. 69, n. 1, p. 59–64, Jan 2012.

WISLOFF, U. e colab. **Intensity-controlled treadmill running in rats: V \dot{V} O $_2$**

max and cardiac hypertrophy. American journal heart circ physiology, p. 1301–1310, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Towards a dementia plan: a WHO guide.** [S.l: s.n.], 2018.

YANG, Si-Yu e colab. **The Effects of Aerobic Exercise on Cognitive Function of Alzheimer's Disease Patients.** CNS & neurological disorders drug targets, v. 14, n. 10, p. 1292–1297, 2015.