

Luciana Hoffert Castro Cruz

**EXERCÍCIO FORÇADO E PRÉVIO À LESÃO MELHORA
PARÂMETROS MOTORES E PRODUÇÃO DE FATORES
NEUROTRÓFICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DA
DOENÇA DE PARKINSON**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2012

Luciana Hoffert Castro Cruz

**EXERCÍCIO FORÇADO E PRÉVIO À LESÃO MELHORA
PARÂMETROS MOTORES E PRODUÇÃO DE FATORES
NEUROTRÓFICOS EM MODELO EXPERIMENTAL DA
DOENÇA DE PARKINSON**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Neurociências da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Neurociências.

Profa. Orientadora: Dra. Leonor Bezerra Guerra
Profa. Co-orientadora: Dra. Patrícia Massara Martinelli

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2012

Tese realizada no Laboratório Profa. Conceição Machado do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Profa. Leonor Bezerra Guerra e co-orientação da Profa. Patrícia Massara Martinelli, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

**Dedico este trabalho ao meu marido
Otavio, pelo companheirismo, apoio,
incentivo e amor.**

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização desse trabalho, principalmente minha família e amigos por me apoiarem incondicionalmente.

Ao meu marido Otávio por ser meu maior incentivador, pela presença, compreensão, ajuda e amor.

À Profa. Leonor Bezerra Guerra, por ser minha orientadora, pela amizade, pelo exemplo.

À Profa. Patrícia Massara Martinelli, por me acolher desde 2005 como sua aluna, pela amizade, paciência, dedicação, orientação valiosa e por seu profissionalismo, honestidade e trabalho. Por abrir as portas da sua casa para as discussões até mesmo em feriados, férias e pelas festas. Sem você esse trabalho não aconteceria.

Aos professores do laboratório, em especial Elizabeth Ribeiro da Silva pelas idéias, críticas, auxílio com o artigo.

Ao técnico Carlos Henrique da Silva pela ajuda valiosa e amizade.

Aos amigos do laboratório Profa. Conceição Machado: Raphael Carrusca, Bárbara Hissa, Fábio Braga, Andrea Moraes e Ísis Nascimento.

Ao Prof. Cândido Celso Coimbra por ceder gentilmente o aparato estereotáxico para cirurgia.

À profa. Cleida Oliveira e André pela ajuda essencial na imunohistoquímica.

À coordenadora do curso de Neurociências Profa. Angela Maria Ribeiro e aos membros da secretaria.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	vii
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Resumo	11
Abstract	12
1. Introdução e justificativa	
1.1 Doença de Parkinson.....	13
1.2 Modelo experimental da doença de Parkinson: administração unilateral de 6-hidroxidopamina na SNpc	19
1.3 O papel dos fatores neurotróficos e exercícios físicos na neuroproteção	22
2. Objetivos	
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. Metodologia	
3.1. Animais.....	32
3.2..Aclimatação à corrida em esteira.....	32
3.3. Avaliação do desempenho físico.....	33
3.4.Exercício físico	34
3.5 Grupos experimentais	35
3.6 Análise comportamental	36
3.6.1 Teste de impressão da pata (<i>Foot print test</i>).....	36
3.6.2 Teste na trave de equilíbrio (<i>Beam balance test</i>).....	38
3.6.3 Teste na grade vertical (<i>Vertical grid test</i>)	39
3.6.4 Teste no campo aberto (<i>Open Field test</i>).....	40
3.7 Indução da lesão aguda da substancia negra pars compacta (SNpc)	41
3.8 Eutanásia	42
3.9 Identificação imunohistoquímica de neurônios dopaminérgicos (tirosina hidroxilase – TH - positivos) e astrócitos (Proteína Acídica Fibrilar Glial - GFAP- positivos) na substância negra do mesencéfalo	43
3.10 Dosagens dos níveis teciduais de fatores neurotróficos.....	44
3.11 Análise estatística e confecção de gráficos	46
4. Resultados	
4.1 Desempenho físico durante a avaliação em esteira	47

4.2 Parâmetros comportamentais motores são influenciados pelo exercício físico prévio à lesão por 6-OHDA em ratos jovens	48
4.2.1 Teste de impressão de pata (<i>Footprint test</i>): exercício físico prévio reduz a instabilidade postural dinâmica de ratos jovens durante o teste de impressão de pata	48
4.2.2 Teste na trave de equilíbrio (<i>Beam balance test</i>): exercício prévio à lesão por 6-OHDA não modifica o equilíbrio estático e dinâmico sobre o aparato	54
4.2.3 Teste na grade vertical (<i>Vertical grid test</i>): ratos sedentários submetidos à lesão por 6-OHDA despenderam mais tempo durante o teste aparato quando comparados a ratos previamente exercitados e lesados	57
4.2.4 Teste no campo aberto (<i>Open field test</i>): exercício prévio à lesão por 6-OHDA não modifica comportamento motor exploratório e movimentação espontânea	65
4.3 Exercício prévio em esteira não impede a morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra do mesencéfalo	68
4.4 Exercício físico prévio em esteira ou lesão da SNpc não modificou a densidade de astrócitos na porção ventral do mesencéfalo	73
4.5 Dosagem tecidual dos níveis dos fatores neurotróficos	80
4.5.1 Efeito do exercício físico prévio em esteira sobre os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo e <i>striatum</i> de ratos jovens	80
4.5.2 Efeito do exercício físico prévio em esteira sobre os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo e <i>striatum</i> de ratos adultos.....	83
4.5.3 Efeito do exercício físico prévio em esteira sobre os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo e <i>striatum</i> de ratos jovens	86
4.5.4 Efeito do exercício físico prévio em esteira sobre os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo e <i>striatum</i> de ratos adultos.....	89
5. Discussão	92
5.1 Perspectivas geradas a partir deste trabalho	108
6. Conclusões	109
7. Referências bibliográficas	110
8. Anexos	128

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
A.P.	Antero-posterior
Akt	Serina/treonina cinase
ART	Artemina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain derived neurotrophic factor)
BSA	Albumina sérica bovina (Bovine serum albumine)
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CREB	Elemento de ligação a proteínas de resposta ao cAMP
D.V.	Dorso-ventral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
ELISA	Ensaio de Imunoadsorção conjugada à enzima (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
GDNF α 1	Receptor α 1 da família do GDNF
GDNF α 3	Receptor α 3 da família do GDNF
GDNF α 3	Receptor α 3 da família do GDNF
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GFR α	Receptores α da família do GDNF (<i>GDNF family receptor α</i>)
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
H ⁺	Íon Hidrogênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
M.L.	Médio-lateral
MAO-B	Monoamina oxidase B
MPP ⁺	1-metil 4-piridinium
MPTP	1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NGF	Fator de Crescimento Neural (<i>Nerve Growth Factor</i>)

NMDA	Receptor glutamatérgico
NT	Neurotrofina
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4/5	Neurotrofina 4/5
NT-6	Neurotrofina 6
NT-7	Neurotrofina 7
NTN	Neurturina
OMS	Organização Mundial de Saúde
P75 ^{NTR}	Receptor p75
PBS	Tampão salina fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction)
PI-3K	Fosfatidilinositol 3 kinase
PPN	Núcleo peduncular pontino
PSP	Persefina
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	Real time Polimerase Chain Reaction
SNpc	Substância negra <i>pars compacta</i>
SNpr	Substância negra <i>pars reticulata</i>
STN	Núcleo subtalâmico
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante β (<i>Transforming Growth Factor β</i>)
Trk	Receptor do tipo tirosina cinase
TrkA	Receptor do tipo tirosina cinase A
TrkB	Receptor do tipo tirosina cinase B
TrkC	Receptor do tipo tirosina cinase C
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais conexões do sistema motor dos núcleos da base e seus neurotransmissores	16
Figura 2. Alteração das principais conexões do sistema motor dos núcleos da base em distúrbios hipocinéticos como a doença de Parkinson	17
Figura 3. Cronograma experimental dos ratos	32
Figura 4. Esteira utilizada para aclimatação, avaliação e exercício físico dos ratos jovens e adultos.....	33
Figura 5. Vista geral do aparato utilizado para o teste de impressão da pata	36
Figura 6. Medidas analisadas no teste de impressão da pata	37
Figura 7. Figura representativa da impressão das patas dianteiras de animal jovem (SED)	37
Figura 8. Vista geral do aparato utilizado para o teste na trave de equilíbrio	38
Figura 9. Vista geral do aparato utilizado para o teste na grade vertical	39
Figura 10. Vista geral do aparato utilizado para o teste no campo aberto	40
Figura 11. Lesão por 6-OHDA gera instabilidade postural dinâmica durante a marcha de ratos sedentários	51
Figura 12. Exercício prévio em esteira impede instabilidade postural dinâmica durante a marcha de ratos	53
Figura 13. Desempenho de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à lesão por 6-OHDA ou seu veículo na trave de equilíbrio	56
Figura 14. Desempenho de ratos jovens sedentários no teste na grade vertical.	60
Figura 15. Desempenho de ratos jovens exercitados no teste na grade vertical.	61
Figura 16. Desempenho na grade vertical de ratos jovens submetidos à lesão por 6-OHDA, sedentários ou previamente exercitados	64
Figura 17. Desempenho motor exploratório e movimentação espontânea de ratos sedentários no teste no campo aberto	67
Figura 18: Desempenho motor exploratório e movimentação espontânea de ratos sedentários no teste no campo aberto	69
Figura 19. Fotografias representativas da substância negra do mesencéfalo pars compacta (SNpc) submetidas à imunomarcagem específica para TH.....	72
Figura 20. Exercício prévio em esteira não foi capaz de prevenir a morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra do mesencéfalo	74
Figura 21. Fotografias representativas da porção ventral do mesencéfalo submetida à imunomarcagem específica para Glial Fibrillary Acidic Protein	77

Figura 22. Exercício prévio em esteira ou lesão não foi capaz de modificar a densidade de astrócitos GFAP-positivos na porção ventral do mesencéfalo	79
Figura 23: Efeito do exercício físico em esteira previamente a lesão por 6-OHDA sobre os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo e striatum de ratos jovens	82
Figura 24: Efeito do exercício físico em esteira previamente a lesão por 6-OHDA sobre os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo e striatum de ratos adultos	85
Figura 25: Efeito do exercício físico em esteira previamente a lesão por 6-OHDA sobre os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo e striatum de ratos jovens	88
Figura 26: Efeito do exercício físico em esteira previamente a lesão por 6-OHDA sobre os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo e striatum de ratos adultos.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição em grupos experimentais dos ratos Wistar submetidos ou não ao exercício físico moderado previamente à injeção intranigral de 6-OHDA ou de seu veículo e submetidos à eutanásia uma hora ou três dias após lesão	35
Tabela 2. Distribuição percentual de ratos jovens e adultos de acordo com a velocidade da corrida em esteira, calculada a partir da avaliação do desempenho físico.....	47

Resumo

Modelos animais são usados para investigar fenômenos subjacentes à patogênese da doença de Parkinson (DP), assim como os efeitos de diversas intervenções terapêuticas no início e progressão da DP, sejam elas neuroprotetoras ou de reabilitação. Os objetivos deste estudo foram (i) investigar se o exercício físico prévio à lesão da substância negra *pars compacta* (SNpc) pode impedir a morte neuronal dopaminérgica, (ii) melhorar sinais motores iniciais no modelo experimental da DP, (iii) verificar a expressão do Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF) e Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) e (iv) reação astrocítica na fase inicial após lesão. Ratos Wistar machos foram exercitados sobre esteira motorizada em intensidade moderada, diariamente, por três semanas, antes da injeção de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na SNpc direita. Foram avaliadas a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, a densidade de astrócitos na porção ventral do mesencéfalo, o padrão de marcha, o equilíbrio, a coordenação motora e a locomoção espontânea. Foram dosados, por ELISA, os níveis de GDNF e BDNF na porção ventral do mesencéfalo e *striatum* em dois momentos: uma hora e três dias após lesão, em ratos jovens e também em ratos adultos. O exercício prévio impediu a instabilidade postural dinâmica durante a marcha e reduziu a dificuldade nos movimentos coordenados contra a gravidade. Ainda, induziu maior expressão inicial de GDNF e BDNF estriatais em animais jovens e adultos, mas não impediu a morte dos neurônios dopaminérgicos. Sugere-se que o exercício físico prévio, ajustado para desempenho físico individual, seja estratégia potencialmente útil para melhorar o comportamento motor e a resposta do sistema nervoso central, com provável participação do GDNF e BDNF, no modelo experimental da DP.

Palavras-chave: 6-OHDA, exercício físico, comportamento motor, GDNF, BDNF, doença de Parkinson, neuroproteção.

Abstract

Animal models are used to investigate the phenomena underlying the pathogenesis of Parkinson's disease (PD) and the effects of neuroprotective or restorative therapeutic interventions on its onset and progression. We aimed to investigate whether previous treadmill exercise can protect against neuronal death in PD rat model, if it can induce astrocytes' reaction. We also aimed to verify if previous treadmill exercise can improve the early motor symptoms of Parkinson disease and if these benefits are due to Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) and Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) early after injury. Male Wistar rats were submitted to daily moderate-intensity exercise on a motorized treadmill for three weeks before the injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in right *substantia nigra pars compacta*. We evaluated dopaminergic neuron survival, density of astrocytes in ventral midbrain, gait pattern, balance and spontaneous locomotion. In addition, GDNF and BDNF levels in ventral midbrain and *striatum* were quantified by ELISA at two moments: one hour and three days after injury, in young and also in adult rats. Preinjury moderate-intensity exercise prevented dynamic postural gait impairment and reduced the difficulty in coordinated movements against gravity. It also induced early expression of striatal GDNF and BDNF, but did not prevent dopaminergic neuron death. In conclusion, we suggested that preinjury physical exercise, adjusted to individual performance, is a potentially useful strategy to improve brain response and motor behavior, probably through GDNF and BDNF expression in 6-OHDA rat model of Parkinson disease.

Keywords: 6-OHDA, preinjury physical exercise, rats, motor behavior, GDNF, BDNF, Parkinson's disease, neuroprotection.

1. INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum na população mundial depois da doença de Alzheimer, sendo caracterizada pelo caráter progressivo dos sinais e sintomas e pela natureza idiopática em 90% dos casos (de Lau, 2006). A DP foi descrita primeiramente por James Parkinson em 1817 em seu trabalho intitulado “*An Essay on the Shaking Palsy*”; neste relato, o autor descreveu os quadros clínicos de seis pacientes cujos sinais abrangeram “movimentos involuntários, tremores nos membros em repouso (...); com a propensão a inclinar o tronco para frente e passar de um passo de caminhada para um passo de corrida; a sensibilidade e intelecto não são afetados” (Parkinson, 1817, republicado em 2002).

Os sinais cardinais utilizados no diagnóstico da DP envolvem bradicinesia ou lentidão de movimento, tremor em repouso e rigidez muscular e instabilidade postural (Lang e Lozano, 1998 a, b). Alterações na marcha são igualmente frequentes em pacientes com a DP, incluindo sinais de redução da velocidade da marcha e do tamanho do passo (Morris *et al.*, 2005; Jankovic, 2008). Além de sintomas motores, a DP cursa com indicativos não motores, como anosmia, constipação intestinal, noctúria, hipotensão ortostática (Chen *et al.*, 2010), alterações no humor e na função cognitiva (Kummer e Teixeira, 2009).

A incidência da DP varia amplamente no mundo, abrangendo entre 1.5 a 22 por 100.000 casos (Wirdefeldt *et al.*, 2011). Considerando países industrializados, a DP geralmente atinge 0.3% da população total e aproximadamente 1% da população cuja faixa etária encontra-se acima de 60 anos de idade (Nussbaum *et al.*, 2003; Chen, 2010); portanto, os valores devem ser ajustados de acordo com a faixa etária da população em estudo (Muangpaisan *et al.*, 2011). A DP no Brasil afeta 3.3% dos indivíduos acima de 64 anos de idade (Barbosa *et al.*, 2006).

Como esperado para uma desordem crônica e com piora progressiva, a DP possui impacto significativo na realização das atividades de vida diária e na qualidade de vida dos pacientes (Gage *et al.*, 2003) e dos familiares ou cuidadores (Martinez-Martin *et al.*, 2008). A progressão inexorável dos sintomas leva também à redução da expectativa de vida do paciente (D'Amelio

et al., 2006). Além disso, Bach e colaboradores (2011) estimam que os custos advindos do tratamento da DP são altos e diretamente proporcionais ao estágio em que a doença se encontra. Esses autores ressaltam, ainda, que comorbidades como a demência e depressão na DP são insuficientemente aventados, e estão diretamente relacionados à piora da qualidade de vida dos pacientes.

A DP é caracterizada histopatologicamente pela morte de neurônios dopaminérgicos localizados principalmente na substância negra do mesencéfalo *pars compacta* (SNpc) (Takahashi e Wakabayashi, 2001). Tal perda neuronal leva a redução do conteúdo de dopamina em sua principal eferência, o *striatum*, o qual é constituído pelos núcleos caudado e putâmen (Jáidar *et al.*, 2010). Estima-se que a disfunção dopaminérgica que resulta no conjunto de sinais envolve, em alguns casos, perda de até 70% de neurônios dopaminérgicos em algumas áreas da SNpc no momento do diagnóstico (Fearnley e Lees, 1991). Ainda, os neurônios remanescentes apresentam inclusões citoplasmáticas originadas por acúmulo da proteína α -sinucleína, proteína neuronal que sob condições normais é encontrada principalmente em terminais pré-sinápticos e atua na regulação da exocitose de vesículas sinápticas por promover estabilidade entre os membros do complexo SNARE (Vekrellis *et al.*, 2011). A α -sinucleína é componente dos corpos de Lewy (Dunning *et al.*, 2011), inclusões citoplasmáticas que estão presentes em locais onde há perda neuronal excessiva devida a DP (Gibb *et al.*, 1998).

A etiologia da DP ainda não é bem esclarecida, mas provavelmente envolve fatores genéticos e ambientais. A disfunção mitocondrial fornece uma explicação genética e fisiopatológica para doenças neurodegenerativas como a DP (Coskun *et al.*, 2011). Outros autores corroboram a hipótese genética da DP, indicando que mutações pontuais no gene da proteína α -sinucleína causam a DP autossômica dominante (Halliday e McCann, 2008). Outros casos de DP familiar revelaram mutações no gene DJ-1 (Maraganore *et al.*, 2004) e nos genes PINK1 e PTEN (Gosal *et al.*, 2006). Mutações no gene *synphilin* têm sido descritas em pacientes com PD esporádica (Marx *et al.*, 2003).

A despeito da etiologia, a disfunção dopaminérgica é a principal característica fisiopatológica da DP. Essa disfunção envolve a via nigro-

estriatal, componente do circuito motor dos núcleos da base (Blandini *et al.*, 2000). Anatomicamente, os núcleos da base abrangem o núcleo caudado, o putâmen, o globo pálido, o corpo amigdalóide e o *claustrum*, a substância inominada, o núcleo *accumbens* e o tubérculo olfatório. Funcionalmente, pode-se acrescentar aos componentes anatômicos dos núcleos da base a substância negra do mesencéfalo *pars compacta* e *pars reticulata*, o núcleo subtalâmico e o núcleo tegmentar peduncular pontino (Levy *et al.*, 1997). Cinco circuitos compõem a comunicação entre o córtex cerebral, centros subcorticais e os núcleos da base. Entretanto, enfatizaremos somente o circuito motor, constituído por vias neurais que conectam o córtex pré-motor, *striatum* e demais núcleos da base à substância negra e ao córtex motor primário, fundamentais para o planejamento, regulação e execução de movimentos voluntários automáticos (Parent *et al.*, 2000).

Segundo Albin e colaboradores (1989) e Smith e colaboradores (1998), o circuito motor dos núcleos da base possui duas vias de ação: a via direta, excitatória, e a via indireta, inibitória. A via direta tem início no córtex cerebral, especificamente em áreas motoras primária, suplementar, pré-motora e somestésica, que se projetam para o *striatum*, substância negra *pars reticulata* e em seguida para porção interna do globo pálido, cujas eferências terminam nos núcleos ventral anterior, lateral e centro-mediano do tálamo e daí os impulsos nervosos são direcionados para área motora primária do córtex cerebral. A via direta provoca a perda da inibição talâmica e maior excitação do córtex motor. A via indireta apresenta ainda a participação da porção externa do globo pálido e do núcleo subtalâmico. O resultado da ativação da via indireta é a redução da atividade motora cortical. Em situações fisiológicas, as eferências dopaminérgicas provenientes da substância negra do mesencéfalo para o *striatum* facilitam a neurotransmissão ao longo da via direta e inibem a propagação dos impulsos nervosos da via indireta.

Estes dois efeitos antagônicos e complementares realizados pela ativação das vias direta e indireta são mediados pelos receptores dopaminérgicos do tipo D1 e do tipo D2, respectivamente (Fig. 1) (Albin *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1998).

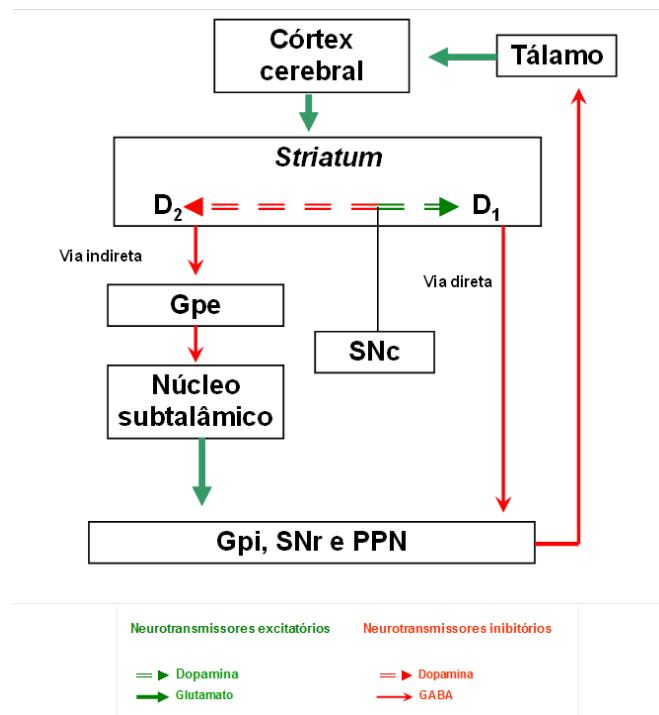


Figura 1: Principais conexões do sistema motor dos núcleos da base e seus neurotransmissores. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; SNc: substância negra *pars compacta*; SNr: substância negra *pars reticulata*; PPN: núcleo tegmentar peduncular pontino; D1: receptor dopaminérgico do tipo D1; D2: receptor dopaminérgico do tipo D2. Fonte: Modificada de Lent, 2010.

A DP altera o planejamento motor, produzindo quadros hipocinéticos, devido à atividade não regulada entre as vias direta e indireta. A deficiência dopaminérgica no *striatum* devida à morte dos neurônios na SNpc, característica marcante da DP, provoca desinibição GABAérgica dos neurônios na origem da via indireta, o que gera acentuada hipoatividade do globo pálido externo, seguido pela desinibição do núcleo subtalâmico. A bradicinesia e acinesia observadas na DP, portanto, resultam do aumento da inibição GABAérgica sobre os neurônios dos grupos ventral anterior, lateral e centro-mediano do tálamo, por excesso de *input* excitatório oriundo do núcleo subtalâmico sobre o globo pálido interno e substância negra *pars reticulata*. A atividade da via indireta, na DP, não é contrabalanceada pela via direta, ambas comprometidas pela disfunção dopaminérgica (Albin *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1998) (Fig. 2).

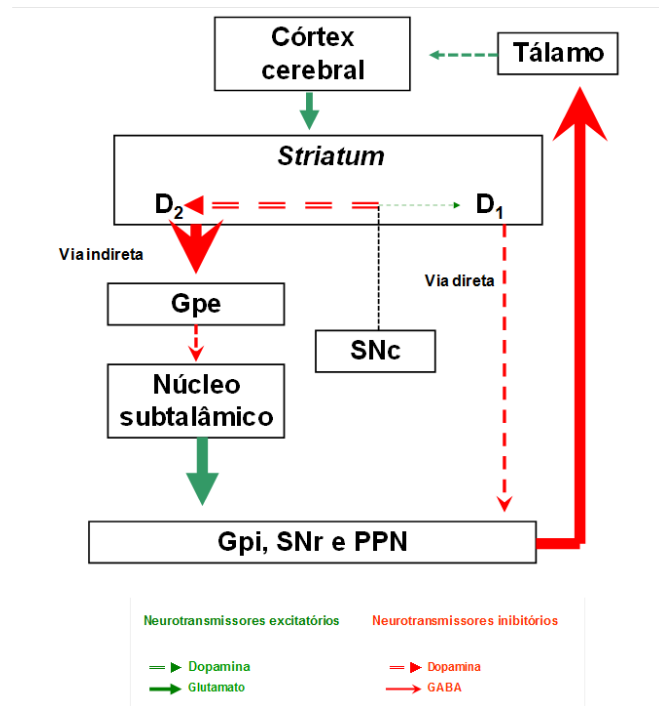


Figura 2: Alteração das principais conexões do sistema motor dos núcleos da base em distúrbios hipocinéticos como a doença de Parkinson. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; SNC: substância negra *pars compacta*; SNr: substância negra *pars reticulata*; PPN: núcleo tegmentar peduncular pontino; D1: receptor dopaminérgico do tipo D1; D2: receptor dopaminérgico do tipo D2. Fonte: Modificada de Lent, 2010.

Considerando o comprometimento da via nigroestriatal por morte dos neurônios dopaminérgicos, o tratamento clássico da DP tem sido fundamentalmente sintomático, direcionado para o controle dos sinais motores por meio de maior oferta dopaminérgica através da administração oral de levodopa (L-dopa) (Lindahl, 2011). A levodopa permanece como a melhor terapia medicamentosa para DP, uma vez que ela melhora dramaticamente a morbidade dos pacientes com a DP. Várias reações adversas, entretanto, podem ser observadas com a cronicidade do seu uso, como discinesias, fenômenos *on-off*, estes, devidos à curta meia-vida da levodopa no plasma sanguíneo, caracterizados por flutuações na concentração da droga no plasma, e consequente exacerbação dos sinais parkinsonianos (Contin e Martinelli, 2010). Sintomas psiquiátricos como agitação, alucinações visuais, psicoses, paranóia, hipersexualidade, entre outros também podem ser observados com o uso crônico de levodopa (Ahlskog, 2011).

Abordagens invasivas para o tratamento da DP podem também ser utilizadas, como estimulação profunda dos núcleos da base, como a do núcleo

subtalâmico (Harries *et al.*, 2011), do núcleo ventral anterior do tálamo ou da perna posterior da cápsula interna (Franzini *et al.*, 2011). Harries e colaboradores (2011) relataram que em pacientes com a DP em estágio avançado, a estimulação bilateral profunda do núcleo subtalâmico provocou melhora funcional dos pacientes, detectada pela Escala Unificada da Doença de Parkinson – *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS). Esta escala avalia prejuízos intelectuais, de humor, motivacionais, na realização das atividades de vida diária, na atividade motora, complicações da terapia medicamentosa, entre outros. Foram observadas ainda, melhora no registro eletrofisiológico neuronal e redução das comorbidades, como discinesias e flutuações do tônus muscular e da quantidade de medicamentos ingeridos. As limitações desta terapêutica baseiam-se no grande número de critérios de exclusão para uso da técnica, como a presença de prejuízos cognitivos, distúrbios comportamentais ou doença psiquiátrica grave; contra-indicações gerais para neurocirurgias; coagulopatias; existência de tratamento imunossupressor; contra-indicações neurorradiológicas como atrofia cerebral grave, lesão axonal difusa; contra-indicações cirúrgica gerais (Limousin e Martinez-Torres, 2008).

Nos últimos anos, a prática de exercícios físicos também tem sido investigada como medida terapêutica na tentativa de se amenizar os efeitos adversos do tratamento farmacológico dos pacientes com DP, tendo como mecanismo básico seus efeitos neuroprotetores (Herman *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2008; Sage e Almeida, 2009). Para validação desta abordagem, modelos experimentais da DP têm sido utilizados para investigar fenômenos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos dessas intervenções e suas relações com a patogênese da DP.

1.2 Modelo experimental da doença de Parkinson: administração unilateral de 6-hidroxidopamina na SNpc

Modelos experimentais são imprescindíveis para estudo dos mecanismos da patogenia, aspectos histológicos e bioquímicos das doenças humanas, e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (Betarbet *et al.*, 2002). O uso de um modelo experimental, entretanto, não fornece todas as

informações necessárias para todos os estudos, e cada um tem uma série de vantagens e desvantagens. Para estudo de algumas doenças, modelos que empregam neurotoxinas têm sido amplamente utilizados, assim como modelos genéticos (Chadchankar *et al.*, 2011). Modelos experimentais da DP que utilizam neurotoxinas almejam elucidar mecanismos fisiopatológicos da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc. Dentre as neurotoxinas amplamente utilizadas em ratos encontra-se a 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

A 6-OHDA é uma neurotoxina catecolaminérgica estruturalmente análoga à dopamina e à noradrenalina, utilizada por mais de 50 anos na produção de modelos experimentais da DP (Ungerstedt, 1968, Ciucci *et al.*, 2011, Lei *et al.*, 2011) e que produz lesão neuronal pela produção de radicais livres (Chang *et al.*, 1999). A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica e, portanto deve ser injetada diretamente em possíveis alvos no sistema nervoso central, como a SNpc, o feixe prosencefálico medial ou o *striatum* (Blum *et al.*, 2001). Quando o objetivo é promover uma depleção dopaminérgica mais seletiva, a SNpc deve ser o alvo da administração da 6-OHDA (Deumens *et al.*, 2002). O mecanismo de toxicidade da 6-OHDA abrange diversas reações bioquímicas, como rápida auto-oxidação, levando à geração de radicais hidroxilas e peróxido de hidrogênio. O elétron não pareado torna os radicais livres altamente reativos, podendo iniciar reações prejudiciais aos substratos de sobrevivência e manutenção das células neuronais (Bowling e Beal, 1995; Ebadi *et al.*, 1996), com conseqüente déficit no funcionamento mitocondrial. A 6-OHDA exerce potente efeito inibitório sobre enzimas mitocondriais, especificamente a cadeia do complexo I e IV (Blum *et al.*, 2001). Devido aos déficits metabólicos gerados pelo bloqueio dessas enzimas, os neurônios não podem exercer normalmente suas funções fisiológicas e morrem (Glinka *et al.*, 1996). O ácido desoxirribonucléico (DNA) mitocondrial é especialmente susceptível ao dano oxidativo, provavelmente pela baixa capacidade de promover reparo frente a lesões, ou mesmo pela proximidade à cadeia transportadora de elétrons (Misiak *et al.*, 2010). A molécula da 6-OHDA é transportada ao interior do corpo celular e aos prolongamentos dos neurônios dopaminérgicos e também noradrenérgicos, causando degeneração dos terminais nervosos. Afeta também o soma neuronal, principalmente quando administrada em regiões de aglomerados de corpos de neurônios dentro do

sistema nervoso central, como é o caso da SNpc (Glinka *et al.*, 1997). Em ratos, uma única injeção de 6-OHDA é suficiente para induzir depleção dopaminérgica unilateral em aproximadamente 95% dos neurônios da SNpc (Bjorklund *et al.*, 1997) e causar morte significativa de neurônios dopaminérgicos na SNpc em apenas 12 horas, seguindo-se a desnervação estriatal entre um e sete dias (Jéon *et al.*, 1995; Blandini *et al.*, 2007).

Além da esperada lesão neuronal e perda do conteúdo dopaminérgico, modelos experimentais fornecem importantes informações acerca das alterações comportamentais. A administração unilateral de 6-OHDA na SNpc de ratos, como modelo experimental da DP, leva a alterações motoras de fácil análise, seja por exame de rotações induzidas por drogas como a apomorfina ou através da aplicação de testes para avaliação da atividade motora (Iancu *et al.*, 2005). A seleção dos testes comportamentais motores deve ser eficiente, de forma que, por meio destes, seja possível identificar alterações, ainda que discretas, nos níveis dopaminérgicos em poucos dias, semanas ou mesmo meses após a lesão. A avaliação do comportamento motor de ratos pode envolver a análise da habilidade das patas anteriores, coordenação motora e equilíbrio (Meredith *et al.*, 2006). As alterações observadas nos modelos animais da DP podem ser correlacionadas com a sintomatologia observada em humanos parkinsonianos. Assim como em humanos, a deficiência dopaminérgica na SNpc de ratos desencadeia quadro de hipocinesia por perda da modulação do *striatum* sobre o globo pálido, que terá uma maior ação inibitória sobre o tálamo (Ciucci *et al.*, 2008).

Durante o exame dos déficits funcionais gerados pela deficiência dopaminérgica unilateral em roedores após a administração de 6-OHDA, são aplicados testes para avaliação de ratos hemiparkinsonianos, seja por administração da 6-OHDA ou outras toxinas, como a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP): análise da atividade motora no campo aberto (*Open field test*), na trave de equilíbrio (*Beam balance test*), teste em grades horizontais ou verticais (*Horizontal / vertical grid test*) (Kim *et al.*, 2010), e o teste de impressão de patas (*Foot print test*) (Fernagut *et al.*, 2002; Metz *et al.*, 2005).

Ratos submetidos à injeção unilateral de 6-OHDA exibem distúrbios característicos de marcha, como desvio do centro de gravidade e centro de

massa para o lado do corpo não afetado durante a locomoção, propulsão e giro (Miklyeva *et al.*, 1995; Muir & Whishaw, 1999). Fernagut e colaboradores (2002) indicaram que a marcha de camundongos submetidos a três diferentes protocolos experimentais de depleção dopaminérgica que não a 6-OHDA apresentou redução no comprimento do passo e da passada, diretamente proporcional à magnitude da morte celular na SNpc ou na porção ventro-lateral do *striatum*. Nesta mesma direção, Metz e colaboradores (2005), indicaram que a análise da marcha por impressão da pata comprovou alterações características nas passadas de ratos hemiparkinsonianos por administração de 6-OHDA. Enquanto animais controle apresentavam passadas de tamanho consistente, animais submetidos à lesão unilateral por 6-OHDA demonstraram sinais de arraste das patas, com passadas significativamente mais curtas. Estes autores concluíram que o modelo experimental utilizando ratos submetidos a 6-OHDA pode ser uma ferramenta válida para o estudo de distúrbios da marcha de pacientes com DP.

Em relação à acinesia e bradicinesia observada na DP, Allbutt e colaboradores (2007) demonstraram que ratos hemiparkinsonianos, após a injeção de 6-OHDA, apresentaram aumento do tempo total gasto para caminhar sobre uma trave de equilíbrio quando comparados a animais não lesados, indicando que a depleção dopaminérgica no *striatum* resultou em atraso no início do movimento e também redução na velocidade do mesmo. Kim e colaboradores (2010) modificaram um teste motor na grade horizontal para um aparato vertical, que requer, além de força neuromuscular e coordenação motora, a ação contra a gravidade. Os resultados deste estudo indicam que os animais submetidos à injeção de MPTP apresentaram aumento no tempo total para descer do aparato, assim como no tempo para girar, indicando dificuldade na coordenação motora e bradicinesia. Potashkin e colaboradores (2010) afirmam que, no modelo clássico de lesão unilateral da SNpc por injeção única de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial, são necessárias duas semanas, a partir da injeção, para indução da depleção dopaminérgica total e portanto, da produção de disfunções motoras detectáveis por testes comportamentais. Pelo exposto, conclui-se que a 6-OHDA injetada diretamente sobre a SNpc pode ser utilizada como modelo experimental da DP, uma vez que ela reproduz a perda de neurônios dopaminérgicos e produz

alteração motora passível de intervenção, possibilitando o estudo de estruturas e mecanismos comprometidos pela depleção dopaminérgica (Deumens *et al.*, 2000).

A função motora abrange sistemas complexos de redes neurais originadas no córtex cerebral, e que terminam nos músculos estriados esqueléticos. A participação de áreas motoras e sensitivas do córtex cerebral, dos núcleos subcorticais, do cerebelo e do tronco encefálico produz uma rede de sinalização eletroquímica para a coordenação dos movimentos voluntários. Para se alcançar funcionamento destas vias e conseqüentemente se obter melhora da função motora normal, a prática de exercícios físicos por indivíduos parkinsonianos tem sido importante estratégia, considerando seu efeito potencializador da plasticidade neuronal (Siegel e Chauhan 2000; Herman *et al.*, 2007; Knaepen *et al.*, 2010; Zoladz *et al.*, 2011).

1.3 O papel dos fatores neurotróficos e exercícios físicos na neuroproteção

A preservação da função neuronal tem sido estudada intensamente nas últimas décadas e pode envolver mecanismos de plasticidade neuronal por meio de fatores neurotróficos (Gomez-Pinilla *et al.*, 2002; Griesbach *et al.*, 2009; Aron e Klein, 2011). Fatores neurotróficos constituem grupo de polipeptídeos que atuam sobre a diferenciação, desenvolvimento, manutenção, e sobrevivência dos componentes do sistema nervoso central e periférico (Thoenen *et al.*, 1987). São capazes também de aprimorar a aprendizagem e proteger neurônios contra diversos insultos (Griesbach *et al.*, 2008; Mattson, 2008).

O estudo da sobrevivência neuronal relacionada aos fatores neurotróficos remete a trabalhos realizados por Rita Levi-Montalcini e Vitor Hamburger, que identificaram um polipeptídeo, denominado posteriormente de Fator de Crescimento Neural (*Nerve Growth Factor* - NGF) (Levi-Montalcini, 1987; Thoenen *et al.*, 1987), que juntamente ao Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (Brain-Derived Neurotrophic Factor – BDNF), à neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT-4/5), neurotrofina 6 (NT-6) e neurotrofina 7 (NT-7) compreendem a família das neurotrofinas (Skaper, 2008). As neurotrofinas

possuem alta similaridade na sequência de seus aminoácidos e exercem suas funções sobre células-alvo por meio de ligações com receptores transmembrana específicos da família dos receptores tirosina cinase (Trk). O NGF interage com o receptor TrkA; o BDNF liga-se ao receptor TrkB ao qual se liga também a NT-4/5. Já a NT-3 interage, principalmente, com o receptor TrkC. As neurotrofinas se ligam, também, com igual afinidade, ao receptor de baixa afinidade ou baixa especificidade, o p75^{NTR} (p75 *neurotrophins receptor* ou p75) (Hennigan *et al.*, 2007).

O BDNF foi isolado, a partir de neurônios de porco, por Barde e colaboradores (1982). O BDNF e seus receptores TrkB e p75 apresentam distribuição difusa no sistema nervoso central de mamíferos em desenvolvimento e adultos. Após sua ligação com o receptor TrkB, há ativação de vias de sinalização da proteína cinase ativada por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinase* – MAPK) e proteína cinase regulada extracelularmente (*Extracellular signal-Regulated protein Kinase* - ERK) e da cinase fosfoinositide 3 (*phosphoinositide 3-kinase* - PI3K), importantes para a sobrevivência neuronal, morfogênese e plasticidade (Numakawa *et al.*, 2010).

Em diversas condições experimentais, os mecanismos fisiológicos envolvidos na neuroproteção de doenças neurodegenerativas têm sido abordados através de estudos que incluem o BDNF (Aoi *et al.*, 2000). Estes trabalhos envolvem a administração intracerebral deste fator neurotrófico (Winkler *et al.*, 1996; Bjorklund *et al.*, 1997; Cass e Manning, 1999), assim como a avaliação de sua produção endógena (Trejo *et al.*, 2001; Ang *et al.*, 2003; Berchtold *et al.*, 2005). Nesta mesma direção, Aliaga *et al.* (2000) relatam, em modelos experimentais, que o BDNF exerce efeito neuroprotetor sobre neurônios dopaminérgicos nigro-estriatais expostos a 6-OHDA, e estes dados são confirmados por Bezard e colaboradores (2003).

Knott e colaboradores (2002), em estudos *post mortem* feitos em SNC de humanos parkinsonianos, demonstraram maior imunomarcagem para BDNF em astrócitos e microglíocitos em áreas adjacentes à substância negra do mesencéfalo, indicando assim, a tentativa da glia local em exercer função neuroprotetora. A neuroplasticidade pode ocorrer através de mecanismos como presença de micróglia reativa (Madinier *et al.*, 2009) e podem incluir a participação de astrócitos ativados (Henning *et al.*, 2008) e fatores

neurotróficos endógenos agindo sobre neurônios e células da glia (Kidd, 2009). Madiner e colaboradores (2009) demonstraram que os níveis de BDNF encontraram-se aumentados quatro e 24 horas após lesão isquêmica no cérebro de ratos, mas não quando analisados após oito dias. Embora a participação de neurônios na neuroplasticidade seja bem estudada, a participação de células da glia ainda é pouco abordada recentemente (Henning *et al.*, 2008; Lončarević-Vasiljković *et al.*, 2009; Pfrieder, 2010). Entretanto, é conhecido que astrócitos se tornam reativos 65 dias após injeção unilateral de 6-OHDA no *striatum* de ratos adultos, apresentando aumento do corpo celular astrocítico e maior número de prolongamentos (Henning *et al.*, 2008), e que, além das neurotrofinas, atuam sobre o sistema nervoso fatores neurotróficos que pertencem à família do Fator Neurotrófico derivado da Glia (Glial cell line Derived Neurotrophic Factor – GDNF). Estes pertencem à superfamília do Fator de Crescimento Transformante β (*Transforming Growth Factor* β - TGF- β) e são o GDNF, a Neurturina (NTN), a Persefina (PSP) e a Artemina (ART). Todos esses fatores se ligam ao mesmo receptor tirosina cinase, o receptor Ret. A atuação do GDNF, NTN, PSP e ART sobre o receptor Ret se dá por meio dos receptores α da família do GDNF (*GDNF family receptor* α - GFR α), que funcionam como co-receptores (Kramer, 2007). O GDNF liga-se preferencialmente ao GFR α 1, a NTN ao GFR α 2, a ART ao GFR α 3 e a PSP ao GFR α 4 (Airaksinen *et al.*, 1999).

O GDNF foi isolado de células B49 de ratos, provenientes da linhagem de células da glia e foi originalmente identificado como importante fator de sobrevivência para neurônios dopaminérgicos (Lin *et al.*, 1993). Ademais, GDNF, NTN e ART promovem a sobrevivência e regulam a diferenciação de neurônios do sistema nervoso periférico, incluindo células neuronais simpáticas, parassimpáticas, sensoriais e neurônios entéricos (Saarma e Sariola, 1999). Por sua ação sobre o sistema motor, o GDNF tem sido estudado em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas, como a DP (Miyazaki *et al.*, 2001). Além dessas afecções predominantemente motoras, o GDNF está relacionado à demência e deficiência cognitiva (Winkler *et al.*, 1996; Airaksinen *et al.*, 1999; Rosenblad *et al.*, 2003).

Connor e Dragunow (1998) hipotetizaram que a DP resultaria da ausência de fatores neurotróficos atuando sobre neurônios dopaminérgicos.

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o GDNF é capaz de exercer efeitos neuroprotetores importantes sobre neurônios dopaminérgicos de roedores (Bjorklund *et al.*, 1997; Aoi *et al.*, 2000), prevenindo a morte destes neurônios induzida por agentes neurotóxicos (Cass e Manning, 1999; Kirik *et al.*, 2000; Cass *et al.*, 2002).

Kearns e colaboradores (1997) demonstraram que o GDNF melhora a função dopaminérgica de ratos jovens submetidos à lesão unilateral por injeção da neurotoxina catecolaminérgica 6-OHDA, confirmando papel importante do GDNF na neuroproteção contra esta droga. Em estudos *in vitro*, Stahl e colaboradores (2011) submeteram fatias de mesencéfalo ventral de ratos à neurotoxina 6-OHDA e ao tratamento com GDNF e BDNF, de forma isolada ou em combinação. A administração dos fatores neurotróficos deu-se de três formas: prévia a 6-OHDA, concomitante ou posterior a 6-OHDA. De qualquer forma, a presença de GDNF e/ou BDNF foi capaz de impedir a redução do número de neurônios tirosina hidroxilase (TH)-positivos da SNpc. A sobrevivência celular foi particularmente manifestada em culturas previamente tratadas com BDNF.

Eslamboli *et al.*, (2005) relataram que a exposição ao GDNF é capaz de promover proteção estrutural e funcional dos neurônios dopaminérgicos na SNpc e de seus terminais axonais no *striatum*. Utilizando-se vetores recombinantes para expressão de GDNF em baixos níveis, foram observados, após a lesão por 6-OHDA, expressão mais acentuada de TH no mesencéfalo, utilizada como medida para verificar a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos dos animais, indicando proteção de aproximadamente 85% dos neurônios contra a 6-OHDA.

Na mesma direção, Smith e Cass (2007) relataram a importância do GDNF como potencial agente neuroprotetor contra a degeneração da substância negra e *striatum* após 6-OHDA em modelo experimental *in vivo* da DP. Neste estudo, GDNF foi administrado a ratos por via intraparenquimatosa previamente à lesão. Os resultados indicaram que houve menor dano por estresse oxidativo dos neurônios dos ratos expostos ao GDNF, além de menor perda do conteúdo dopaminérgico nestas mesmas áreas.

Estímulos ambientais e lesões são fatores que produzem modificações no sistema nervoso central (Yoon *et al.*, 2007; Caleo *et al.*, 2009; Tajiri *et al.*,

2010). Essas modificações envolvem processos de neuroplasticidade que ocorrem através de mecanismos diversos e podem incluir a participação de fatores neurotróficos endógenos, brotamento axonal colateral e consequente aumento da densidade de fibras nervosas (Caleo *et al.*, 2009) e melhora funcional após lesão (Yoon *et al.*, 2007). O exercício físico constitui prática não invasiva para alcançar a neuroproteção em modelos experimentais da DP, com o objetivo de se aprimorar a resposta ao tratamento medicamentoso (Archer *et al.*, 2010; Fredriksson *et al.*, 2011).

Faherty e colaboradores (2005) demonstraram que a exposição a ambiente enriquecido, em situações que envolvem exercícios físicos e desafios motores, cognitivos e sociais, é capaz de aumentar os níveis de GDNF na SNpc e impedir a morte neuronal causada por neurotoxina que mimetiza a DP em camundongos. Ciucci *et al.* (2008) corroboram estes resultados, indicando que a atividade física pode promover benefícios funcionais nos animais submetidos à neurotoxina 6-OHDA, e que a não utilização de um segmento corpóreo funcionalmente prejudicado pode agravar a morte neuronal.

Molteni *et al.* (2002), estudando a neuroproteção desencadeada por exercícios físicos realizados por ratos após injúria tecidual, demonstraram que o aumento da expressão de fatores neurotróficos como NGF e BDNF após a prática de exercício físico altera a plasticidade neuronal, atuando nas terminações pré e pós-sinápticas. Este estudo demonstrou que os genes supra-regulados pela atividade física são membros da maquinaria específica para o tráfego de vesículas sinápticas ou são parte de vias intracelulares como segundos mensageiros, cuja ativação afeta a função sináptica.

Na terminação pré-sináptica, os exercícios físicos atuam sobre o BDNF e sobre proteínas imprescindíveis para a transmissão sináptica, como a sinapsina e sinaptofisina, modulando assim, a liberação de neurotransmissores (Matsumoto *et al.*, 2006). O efeito dos exercícios físicos na terminação pós-sináptica pode ativar a cascata de sinalização MAP cinase. Quando ativada, esta enzima pode agir sobre fatores de transcrição nucleares, como CREB, também supra-regulado pelos exercícios físicos (Molteni *et al.* 2002). Grande parte dos genes abordado nesse estudo foi afetada pela prática de exercícios físicos voluntários e está diretamente relacionada ao BDNF, reforçando a idéia de que esta neurotrofina possui papel crucial nos mecanismos pelo qual o

exercício físico promove a plasticidade neural. Ainda, a expressão do receptor do BDNF, TrkB, também é aumentada pela atividade física.

Vaynman e colaboradores (2006) demonstraram que o exercício físico promove aumento da expressão de sinapsina 1 e sinaptofisina, mas não da syntaxina. Estes autores demonstraram também que o bloqueio da ação do BDNF sobre neurônios hipocampais gera redução na expressão destas mesmas proteínas. Na mesma direção, Ying *et al.*, (2005) mostraram que exercícios físicos praticados por ratos após lesão por hemiseção da medula espinhal restabelecem níveis de BDNF e influenciam a plasticidade sináptica, por aumentar os níveis de sinapsina 1 e da proteína CREB que se liga ao mediador químico intracelular AMPc (3', 5',-cicloadenosina-monofosfato – AMPc). Estudos prévios já haviam demonstrado que os exercícios físicos por si só aumentam a expressão de BDNF e NT-3 na medula espinhal de ratos hígidos (Gómez-Pinilla *et al.*, 2002).

Exercícios físicos voluntários realizados em rodas por ratos submetidos a traumatismo cranioencefálico estão diretamente relacionados ao aumento dos níveis de BDNF no hipocampo e à melhora cognitiva em testes comportamentais (Griesbach *et al.*, 2009). Apesar de outros fatores neurotróficos atuarem sobre a plasticidade neuronal, o aumento nos níveis de BDNF e de moléculas associadas ao seu mecanismo de ação, tem sido foco de grande interesse nos estudos relacionados à plasticidade neuronal associada à prática de exercícios físicos (Vaynman e Gomez-Pinilla, 2005).

Carro e colaboradores (2001) demonstraram que o exercício físico não somente atenua o impacto de lesão excitotóxica sobre neurônios da formação hipocampal de camundongos adultos como também impede a progressão do processo neurodegenerativo instalado pela injeção intraperitoneal de ácido domóico. Estes mesmos autores, utilizando outro modelo experimental (camundongos com neurodegeneração hereditária das células de Purkinje do cerebelo), demonstraram que a prática de exercícios físicos durante a idade jovem restabelece o número dessas células no córtex cerebelar.

Camundongos jovens, com três semanas de idade, expostos ao ambiente enriquecido, por dois meses, período após o qual são considerados adultos, apresentaram maior expressão de genes relacionados à neuroplasticidade e a diversas funções como proliferação e diferenciação

celular, diferenciação, sinalização intracelular e transcrição. Dentre esses genes que foram mapeados no *striatum* de camundongos jovens, encontram-se PKC lambda e MAP3K e outros (Thiriet *et al.*, 2008). MAP3K parece estar envolvida no desenvolvimento do sistema nervoso central em camundongos (Hirai *et al.*, 2005) e também no crescimento axonal e migração neuronal (Hirai *et al.*, 2006). Dentre os genes estudados por Thiriet e colaboradores (2008), PKC lambda foi escolhido pela participação em diversos processos de sinalização intracelulares, incluindo a plasticidade sináptica.

Dados de Yoon e colaboradores (2007) demonstram que ratos submetidos ao exercício físico em esteira por 14 dias consecutivos após lesão da SNpc pela 6-OHDA apresentaram níveis mais elevados de fatores neurotróficos como o BDNF e GDNF. Tajiri e colaboradores (2010) relataram recentemente o efeito do exercício forçado em esteira por quatro semanas após lesão por 6-OHDA sobre os níveis de GDNF no *striatum* de ratos. Os níveis de GDNF apresentaram-se aumentados em análise por *western-blotting* quando comparados a animais sedentários e não lesados. Estes autores demonstraram também que ratos submetidos ao exercício em esteira após a lesão por 6-OHDA apresentam menor número de rotações induzidas por apomorfina, melhor desempenho no teste comportamental do cilindro, redução significativa da morte neuronal e maior proliferação e migração de células progenitoras de neurônios, quando comparados a animais sedentários. Estes autores sugerem, portanto, que o exercício físico em esteira pode apresentar-se como uma estratégia terapêutica para condições de lesão da substância negra do mesencéfalo.

Desta forma, o esclarecimento da possível neuroproteção por meio de exercício físico e de fatores neurotróficos pode ser importante na abordagem de patologias neurodegenerativas.

Pela literatura revista, observamos que os modelos experimentais da doença de Parkinson são úteis para investigar a influência do exercício físico, dos fatores neurotróficos e de células da glia como mediadores de neuroplasticidade no sistema nervoso central. Observa-se que, apesar dos dados da literatura sugerirem que o exercício físico realizado posteriormente à lesão da SNpc pode melhorar sintomas motores e preservar as terminações dopaminérgicas estriatais, ainda não se esclareceu se a intensidade deste

exercício é adequada aos animais e se o exercício físico prévio é capaz de promover proteção contra a 6-OHDA.

As questões iniciais para o desenvolvimento deste trabalho consistiram em:

- Ratos submetidos ao modelo experimental da DP são beneficiados pela exposição a um programa prévio de exercício físico moderado durante três semanas?
- Ratos exercitados apresentam sinais precoces de degeneração dopaminérgica, três dias após a lesão, como ratos sedentários?
- Parâmetros histológicos como a taxa de sobrevivência de neurônios TH-positivos e densidade de astrócitos GFAP-positivos são influenciados pelo exercício físico prévio à lesão?
- Parâmetros comportamentais como a marcha, equilíbrio, coordenação motora e movimentos exploratórios espontâneos são diferentemente afetados em animais sedentários ou exercitados?
- Parâmetros bioquímicos como a dosagem de níveis protéicos de GDNF e BDNF são diferentemente afetados em animais sedentários ou exercitados?
- Há diferença nos níveis destes fatores neurotróficos entre ratos jovens e adultos nestas condições experimentais?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito neuroprotetor do exercício físico prévio em esteira sobre a resposta inicial à lesão da substância negra por 6-OHDA.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do exercício físico prévio em esteira sobre o comportamento motor de ratos jovens submetidos à lesão da substância negra do mesencéfalo por 6-OHDA, três dias após a lesão.
- Avaliar o efeito do exercício físico prévio em esteira sobre a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos três dias após a administração de 6-OHDA em ratos jovens.
- Avaliar o efeito do exercício físico prévio em esteira sobre a densidade de astrócitos na porção ventral do mesencéfalo ratos jovens submetidos ou não à administração de 6-OHDA.
- Avaliar o efeito do exercício físico prévio em esteira sobre a produção de GDNF e de BDNF na porção ventral do mesencéfalo e *striatum* de ratos jovens e também em adultos submetidos ou não à administração de 6-OHDA.

3.MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 102 ratos Wistar, machos, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Ao serem adquiridos, os animais tinham 21 dias de idade e permaneceram no biotério de experimentação do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, tendo sido deslocados ao laboratório para os procedimentos previstos no estudos e para eutanásia, de acordo o cronograma experimental apresentado na figura 3. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA 06/2006).

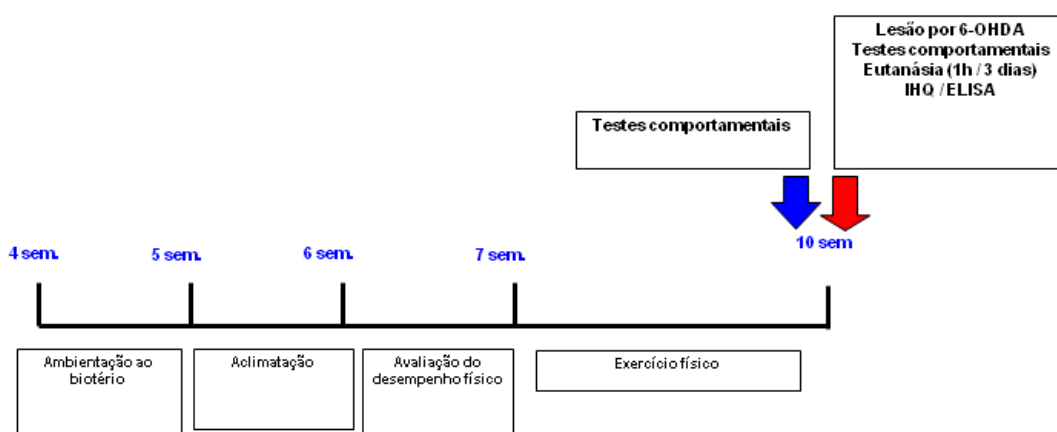


Fig.3: Cronograma experimental dos ratos (n=102). 6-OHDA: 6-hidroxidopamina. IHQ: Técnicas de imunohistoquímica. ELISA: “*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*”.

Os animais foram mantidos em estantes climatizadas (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brasil) a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, em gaiolas plásticas, recebendo ração comercial (Nuvilab, Canguiri Colombo, Paraná, Brasil) e água à vontade. Em cada gaiola mantiveram-se, em média, quatro animais. Todos os animais foram submetidos à rotina do biotério, em ciclo claro/escuro de 12 horas, em que as luzes eram acesas às 7:00 e desligadas às 19:00.

3.2 Aclimação à corrida em esteira

Após período de ambientação ao biotério, os animais, com cinco semanas de idade, foram aclimatados ao ambiente de atividade locomotora,

sendo expostos, por cinco dias consecutivos, ao aparato da esteira elétrica composta por cinco pistas individuais (Gaustec Magnetismo, Nova Lima, Minas Gerais, Brasil) (Fig. 4).



Fig. 4. Esteira utilizada para aclimação, avaliação e exercício físico dos ratos – ver texto para maiores detalhes. Fonte: arquivo pessoal.

Cada animal era mantido na esteira, ainda desligada, com inclinação da pista a 15°, durante cinco minutos. Decorrido este tempo, a esteira era ligada e a velocidade aumentada gradualmente por cinco segundos até atingir 10 metros por minuto (m/min). Os ratos foram, então, estimulados pela grade de estimulação elétrica (choque com intensidade de 0.1mA) a locomover-se sobre a pista durante mais cinco minutos, ao final dos quais eram devolvidos às respectivas gaiolas.

3.3 Avaliação do desempenho físico

Animais jovens (com seis semanas de idade) foram submetidos à avaliação individual do desempenho físico, na mesma esteira elétrica já descrita, segundo protocolo proposto pelo laboratório de Endocrinologia e Metabolismo, sob supervisão do prof. Cândido Celso Coimbra, do departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB/UFMG (adaptado de Hussain *et al.*, 2001) e descrito a seguir.

A avaliação do desempenho físico foi constituída de três sessões de exercícios realizadas em dias alternados. De forma similar à fase de aclimação, inicialmente os ratos foram expostos ao aparato da esteira, elétrica com velocidade nula por cinco minutos e, decorrido este período, a velocidade da esteira foi aumentada gradualmente por cinco segundos até

atingir a velocidade de 10 m/min. A partir deste momento, a cada três minutos, a velocidade foi aumentada em um metro por minuto, até a fadiga. Considerou-se como fatigado, o animal que permanecia imóvel sobre a grade de estimulação elétrica durante dez segundos consecutivos ou durante dois segundos, por no mínimo três vezes, em um período de 60 segundos. Nestas situações, o animal era retirado da esteira, sendo registrado o tempo total de permanência em atividade, assim como a velocidade máxima em que o animal correu.

A cada três minutos, o trabalho realizado pelo animal em um dia de avaliação foi estimado (Balthazar *et al.*, 2009), de acordo com a seguinte fórmula:

$$W = p.t.v.\text{sen}\theta$$

Onde, W = trabalho em joules; p = peso corporal em Kg; t = tempo em minutos; v = velocidade em m/min; $\text{sen}\theta$ = seno da inclinação da esteira em graus (15°).

O trabalho total do animal foi calculado pela média aritmética dos três dias de avaliação.

Sendo assim, a velocidade encontrada no momento, correspondente a 50-60% da média do trabalho total foi selecionada para ser utilizada durante o exercício físico prévio à lesão da SNpc ou administração de veículo. A avaliação do desempenho físico possibilitou estabelecer os parâmetros de exercício físico moderado para cada animal, individualmente. Os animais que permaneceram imóveis sobre a grade de estimulação elétrica durante dez segundos consecutivos ou durante dois segundos, por no mínimo três vezes, em um período de 60 segundos constituíram o grupo de animais sedentários. O grupo de animais sedentários também incluiu animais que se deslocaram na esteira, mas que não foram submetidos ao exercício físico.

3.4 Exercício físico

O exercício físico, de intensidade moderada, consistiu em corrida na esteira elétrica, por 30 minutos, com inclinação de 15° , em sete dias consecutivos durante três semanas. Para caracterização do exercício físico de

intensidade moderada, a velocidade correspondente a 50-60% da média do trabalho total foi utilizada no exercício físico dos ratos, específica para cada animal (Brooks & White, 1978; Hussain *et al.*, 2001).

3.5 Grupos experimentais

Após as três semanas de exercício físico em esteira, realizado por parte dos animais, constituíram-se os seguintes grupos experimentais como explica a tabela 1:

Tabela 1: Distribuição em grupos experimentais dos ratos Wistar sedentários (SED) ou exercitados (EX) em esteira com intensidade moderada, previamente à injeção intranigral de 6-OHDA ou de seu veículo (*SHAM*), e então submetidos à eutanásia uma hora ou três dias após lesão.

Grupos experimentais	Procedimentos experimentais	Tempo após a lesão (Eutanásia)	
		1 hora	3 dias
SED	Ratos sedentários não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico	n=5	n=12
SED <i>SHAM</i>	Ratos sedentários submetidos ao veículo da 6-OHDA	n=5	n=12
SED 6-OHDA	Ratos sedentários submetidos à lesão da SNpc por 6-OHDA	n=5	n=12
EX	Ratos exercitados e não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico	n=5	n=12
EX <i>SHAM</i>	Ratos exercitados submetidos ao veículo da 6-OHDA	n=5	n=12
EX 6-OHDA	Ratos exercitados submetidos à lesão da SNpc por 6-OHDA	n=5	n=12
TOTAL		n = 30	n = 72

3.6 Análise comportamental

Os ratos foram submetidos aos testes comportamentais em dois momentos: durante a última semana de exercício físico, previamente à lesão por 6-OHDA e três dias após a injeção da 6-OHDA. Ratos sedentários foram avaliados nos mesmos dias que ratos exercitados.

Todos os ratos foram habituados ao experimentador por cinco minutos imediatamente antes do teste. A realização de cada teste em cada animal, com exceção do teste da impressão de pata, foi registrada por meio de câmera digital Sony Cyber-shot, 7.2 megapíxels, cuja filmagem era analisada posteriormente para avaliação do desempenho motor dos animais. Cada teste e seus respectivos aparatos estão descritos a seguir.

3.6.1 Teste de impressão da pata (*Foot print test*)

Ratos EX, EX *SHAM* e EX 6-OHDA foram submetidos ao teste de impressão de patas no último dia de exercício físico, logo após a realização deste (dia 1). Ratos SED, SED *SHAM* e SED 6-OHDA foram testados no mesmo dia em que os ratos exercitados. O teste foi repetido três dias após a lesão da substância negra do mesencéfalo por 6-OHDA (SED 6-OHDA e EX 6-OHDA) ou administração de seu veículo (SED *SHAM* e EX *SHAM*) (dia 2). Ratos não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (SED e EX) foram avaliados nos mesmos dias que os demais animais.

Os animais tiveram suas patas dianteiras tingidas com tinta comercial não tóxica (guache, Faber Castel, São Carlos, São Paulo) e foram colocados para caminhar em um corredor de madeira cujo chão estava coberto por papel milimetrado (40 cm x 12 cm) e que terminava numa caixa de madeira escura (Fig. 5) (Fernagut *et al.*, 2002; Metz *et al.*, 2005).



Figura 5: Vista geral do aparato utilizado para o teste de impressão da pata – ver texto para maiores detalhes. Fonte: arquivo pessoal.

O número de passos, o comprimento da passada, o comprimento do passo e a largura do passo (Fig. 6) foram os parâmetros mensurados manualmente e analisados. Entende-se por passo (Fig. 6a) a distância entre a impressão da pata direita e a impressão da pata esquerda. A passada (Fig. 6b) foi determinada pela medida da distância entre a impressão de uma pata (direita ou esquerda) e a próxima impressão da pata ipsilateral. O comprimento do passo e da passada são medidas parciais, indicativas da velocidade e estabilidade durante a marcha. Finalmente, por largura do passo (Fig. 6c)

define-se a distância entre a impressão das patas direita e esquerda dentro do mesmo passo. A largura do passo é medida indicativa da base de suporte e do centro de gravidade durante a marcha, assim como da estabilidade postural dinâmica. A figura 7 é representativa do teste da impressão das patas dianteiras realizado em animal jovem sedentário, não submetido a qualquer procedimento cirúrgico (SED).

6

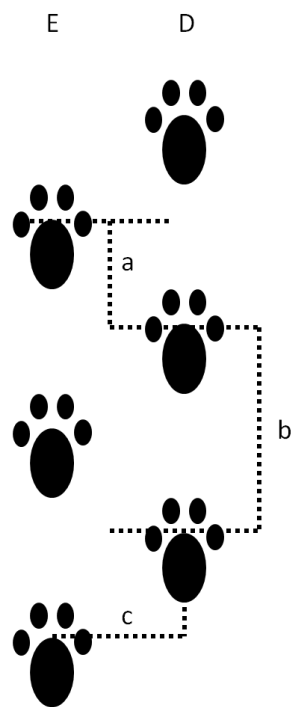


Fig. 6: Medidas analisadas no teste de impressão da pata. E: lado esquerdo. D: lado direito. a: passo. b: passada. c: largura do passo. Fonte: arquivo pessoal

7

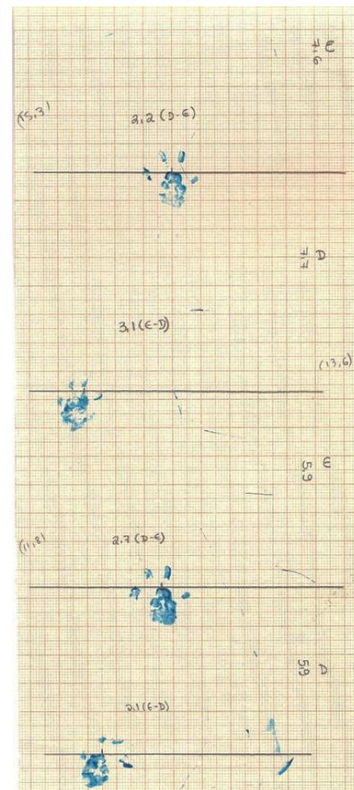


Fig. 7: Figura representativa da impressão das patas dianteiras de animal jovem (SED). Fonte: arquivo pessoal.

As médias dos valores obtidos para o comprimento do passo, comprimento da passada e para largura do passo foram comparadas através de análise intra e intergrupos.

3.6.2 Teste na trave de equilíbrio (*Beam balance test*)

Ratos EX, EX *SHAM* e EX 6-OHDA foram submetidos ao teste na trave de equilíbrio em três tentativas consecutivas na última semana de exercício físico, logo após a realização deste. As duas primeiras tentativas constituíram a fase de adaptação e aprendizagem. A terceira compôs a avaliação prévia à lesão e foi denominada dia 1. Ratos SED, SED *SHAM* e SED 6-OHDA foram testados no mesmo dia em que os ratos exercitados. O teste foi repetido três dias após a lesão da substância negra do mesencéfalo por 6-OHDA (SED 6-OHDA e EX 6-OHDA) ou administração de seu veículo (SED *SHAM* e EX *SHAM*) (dia 2). Ratos não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (SED e EX) foram avaliados nos mesmos dias que os demais animais.

O aparato da trave de equilíbrio consistiu em uma placa de madeira (31.5 cm x 1.8 cm) (Fig. 8), elevada a 80 cm do chão por suportes também de madeira. Cada animal foi colocado individualmente sobre a trave de equilíbrio por 60 segundos (tempo de permanência ou latência). Em caso de queda ou se o animal descesse do equipamento, a latência era registrada (Fugimoto *et al.*, 2004; Kharatishvili *et al.*, 2009). Com o objetivo de amortecer possível queda do animal, uma caixa contendo maravalha foi colocada abaixo do equipamento.



Figura 8: Vista geral do aparato utilizado para o teste na trave de equilíbrio – ver texto para maiores detalhes. Fonte: arquivo pessoal.

As médias dos valores obtidos para latência foram comparadas através de análise intra e intergrupos.

3.6.3 Teste na grade vertical (*Vertical grid test*)

Ratos EX, EX *SHAM* e EX 6-OHDA foram submetidos ao teste na grade vertical em duas tentativas consecutivas na última semana de exercício físico, logo após a realização deste. A primeira tentativa constituiu a fase de

adaptação e aprendizagem. A segunda compôs a avaliação prévia à lesão e foi denominada dia 1. Ratos SED, SED *SHAM* e SED 6-OHDA foram testados no mesmo dia em que os ratos exercitados. O teste foi repetido três dias após a lesão da substância negra do mesencéfalo por 6-OHDA (SED 6-OHDA e EX 6-OHDA) ou administração de seu veículo (SED *SHAM* e EX *SHAM*) (dia 2). Ratos não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (SED e EX) foram avaliados nos mesmos dias que os demais animais.

O aparato para o teste da grade vertical consistiu em um equipamento de madeira de 15 x 60 x 5 cm, com uma tela de arame com malha de 0.8 x 0.8 cm, adaptado de Kim et al. (2010). Para estabilidade, a parte inferior do aparato possui uma extensão de 12 cm para frente e para trás (Fig. 9).



Figura 9: Vista geral do aparato utilizado para o teste na grade vertical – ver texto para maiores detalhes. Fonte: arquivo pessoal.

Durante o procedimento experimental, o rato foi cuidadosamente posicionado com a cabeça dirigida para cima, a cinco centímetros do topo, permitindo-lhe o movimento de virar e descer. Os parâmetros analisados foram o tempo gasto para girar da posição inicial para a posição de descida, tempo gasto para descer e tempo total de teste, desde a colocação do animal no aparato até sua chegada à base. Este teste oferece o componente de movimento do animal contra e a favor a gravidade, exigindo maior controle, coordenação motora e equilíbrio dinâmico. O objetivo deste teste foi verificar a capacidade do rato em descer da grade com o focinho direcionado para baixo, em menor tempo possível, sem deslizamentos ou quedas.

As médias dos valores registrados de tempo gasto para girar da posição inicial para a posição de descida, tempo gasto para descer e tempo total de teste foram comparadas através de análise intra e intergrupos.

3.6.4 Teste no campo aberto (*Open field test*)

Ratos EX, EX *SHAM* e EX 6-OHDA foram submetidos ao teste no campo aberto no último dia de exercício físico, logo após a realização deste (dia 1). Ratos SED, SED *SHAM* e SED 6-OHDA foram testados no mesmo dia em que os ratos exercitados. O teste foi repetido três dias após a lesão da substância negra do mesencéfalo por 6-OHDA (SED 6-OHDA e EX 6-OHDA) ou administração de seu veículo (SED *SHAM* e EX *SHAM*) (dia 2). Ratos não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (SED e EX) foram avaliados nos mesmos dias que os demais animais.

O aparato de campo aberto consistiu em uma caixa de madeira (60 x 60 x 30 cm) sem tampa, em cujo interior os animais foram mantidos por cinco minutos (Fig. 10).



Figura 10: Vista geral do aparato utilizado para o teste no campo aberto – ver texto para maiores detalhes. Fonte: arquivo pessoal.

O piso da caixa foi virtualmente dividido em quatro quadrantes. Os animais foram sempre colocados no quadrante superior esquerdo. Os parâmetros analisados foram o número de quadrantes visitados, o número de *rearing*, posição caracterizada pelo apoio somente das patas traseiras e o tempo gasto em *grooming*, ritual de limpeza da cabeça, vibrissas, tronco, genitais e rabo (Fornaguera *et al.*, 2001).

As médias dos valores obtidos para número de quadrantes visitados, número de *rearing* e tempo gasto em *grooming* foram comparadas através de análise intra e intergrupos.

3.7 Indução de lesão aguda da substância negra *pars compacta* (SNpc)

Conforme indicado pela tabela 1, parte dos ratos, exercitados ou não, foram submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção de 6-OHDA, ou de seu veículo, na substância negra do mesencéfalo *pars compacta*, do lado direito, como descrito em trabalho prévio deste grupo (Hoffert, L., 2007).

Os animais foram anestesiados com 2.2.2-tribromoetanol (25mg/100 g de peso corporal) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). A localização da substância negra do mesencéfalo, lado direito, foi estimada com bregma e lambda horizontais e com as coordenadas estereotáxicas adaptadas de Paxinos e Watson (2005): anteroposterior (AP) -5.2 mm, médio-lateral (ML) -2.2 mm, dorsoventral (DV) -8.6 mm, a partir do bregma. Para a injeção intraparenquimatosa de 6-OHDA ou de seu veículo, utilizou-se agulha (13 x 0.3 mm ou 30 Gauge) (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), conectada a uma seringa de 10 µl (Hamilton Microliter Gastight Syringer, Reno, NV, EUA) por meio de um tubo de polietileno (Intramedic Poliethylene Tubes, Clay Adams, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). A solução estéril de 6-OHDA (Sigma Aldrich LLC, St. Louis, MO, EUA), na concentração de 2.5 mg/ml contendo NaCl 0.9% e ácido ascórbico a 0.02% foi utilizada imediatamente após seu preparo. Injetou-se volume de 4 µl por animal, com auxílio de bomba injetora manual, à velocidade de 0.5 µl/min, durante 8 minutos. A agulha permaneceu posicionada por dois minutos adicionais após a injeção, para permitir a difusão completa de toda solução.

Finalizado o procedimento, e após sutura da pele, os animais permaneceram em gaiolas individuais até a recuperação do estado induzido pela anestesia. O procedimento cirúrgico de cada animal não excedeu 60 minutos. Os animais permaneceram no biotério de experimentação do Departamento de Morfologia por três dias ou foram levados para sala de

eutanásia para colheita de material uma hora após administração intranigral de 6-OHDA.

3.8 Eutanásia

Três dias após a administração de 6-OHDA ou de seu veículo, animais de cada um dos referidos grupos experimentais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 2.2.2-tribromoetanol (25mg/100 g de peso corporal) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e então submetidos à eutanásia. Os animais cujo material coletado visava análise imunohistoquímica foram fixados por perfusão intracardíaca, utilizando-se paraformaldeído 4% em solução de tampão fosfato, 0.1M, pH 7.2. Os animais cujo material coletado objetivava a dosagem de fatores neurotróficos não foram submetidos à fixação. A eutanásia de animais que não foram submetidos à fixação se deu por decapitação após anestesia. Procedeu-se à retirada do encéfalo do crânio. Amostras dos lados direito e esquerdo da porção ventral do mesencéfalo e do *striatum* foram coletadas. No caso de amostras frescas, as mesmas foram dissecadas, imediatamente congeladas em gelo seco e estocadas a -70°C até processamento pela técnica de ELISA. No caso de amostras fixadas, foram coletados cortes coronais de aproximadamente 0.5 cm de espessura, abrangendo a região desejada, porção ventral do mesencéfalo (bregma -4.8 mm to -5.3 mm), os quais foram imersos por três dias na mesma solução fixadora de paraformaldeído 4% em solução de tampão fosfato, 0.1M, pH 7.2 e processados para inclusão em parafina.

3.9 Identificação imunohistoquímica de neurônios dopaminérgicos (tirosina hidroxilase – TH - positivos) e astrócitos (Proteína Acídica Fibrilar Glial - GFAP- positivos) na substância negra do mesencéfalo

Secções frontais de 5µm de espessura foram obtidas em micrótomo, sendo que a primeira secção obtida foi corada com Azul de Toluidina para localização precisa da área histológica a ser analisada. As secções subseqüentes foram submetidas a processo de imunomarcção para TH ou

para GFAP. Resumidamente, para bloqueio prévio de peroxidase endógena, utilizou-se solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 0.6 % e metanol a 10%. Para impedir a ligação entre avidina e biotina endógena, foi utilizado o kit de bloqueio Vector (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Para bloqueio de ligação inespecífica do anticorpo foi utilizado soro normal de cabra a 10% em PBS. As secções foram, então, incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-tirosina hidroxilase (Roche, Alemanha) ou com anticorpo policlonal anti-GFAP (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA), ambos diluídos na proporção de 1:100, em tampão PBS, por aproximadamente 12 horas, seguido por incubação com anticorpo anti-espécie biotilado, na proporção de 1:100 em PBS, por uma hora. A imunoreatividade foi visualizada utilizando-se complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e revelação enzimática por imersão das secções em solução aquosa de 3.3'-diaminobenzidina a 0.05 %, contendo 0.01% de H₂O₂ (Sigma Aldrich LLC, St. Louis, MO, EUA). Todo o procedimento foi realizado em câmara úmida.

Os neurônios TH-positivos com núcleos visíveis no plano de corte foram contados por área de substância negra do mesencéfalo *pars compacta* do lado direito e do lado esquerdo em cada animal, em todos os grupos experimentais. A taxa de sobrevivência dos neurônios foi calculada em porcentagem relativa à densidade de células TH-positivas no lado lesado (direito) dividido pela densidade de células TH-positivas no lado intacto (esquerdo), de acordo com Yoon et al. (2007).

Para contagem de astrócitos GFAP positivos foi calculada a área de imunoreatividade (caracterizada como densidade de marcação) em uma área total de $196 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ da porção ventral do mesencéfalo, do lado direito e do lado esquerdo em cada animal em todos os grupos experimentais. A densidade dos astrócitos foi calculada como a densidade de marcação positiva no lado direito dividido pela densidade de marcação positiva no lado esquerdo.

As imagens foram obtidas no microscópio Axioplan-2 (Zeiss, Jena, Alemanha) e analisadas pelo *software* AxionVision (versão 4.7, Zeiss, Jena, Alemanha).

3.10 Dosagens dos níveis teciduais de fatores neurotróficos

Para a análise dos níveis de fatores neurotróficos na porção ventral do mesencéfalo e *striatum*, além dos animais indicados pela tabela 1, foram utilizados 60 animais adultos, com 24 semanas de idade, submetidos ou não a exercício físico prévio com intensidade moderada, em esteira, por três semanas e submetidos, ou não à lesão por 6-OHDA. Os grupos experimentais dos animais adultos seguiram o protocolo experimental dos animais jovens, porém, cinco animais foram utilizados em cada subgrupo experimental.

Para dosagem de fatores neurotróficos, utilizou-se tecido congelado fresco. Amostras de tecido da porção ventral do mesencéfalo e *striatum* dos animais jovens e adultos, sacrificados uma hora ou três dias após a administração de 6-OHDA, foram homogeneizadas e tratadas de acordo com Bennett *et al.* (1999), como se segue. As amostras foram imersas em 600 µl de tampão de lise, contendo inibidores enzimáticos, preparado no dia e mantido no gelo (TRIS-HCl 20 mM – pH 8, NaCl 137 mM, NP40 1%, Glicerol 10%, Aprotinina A 1mM, Pepstatina A 1µM, EDTA 10 mM, E-64 10 µM, Vanadato de sódio 0.5 mM). As amostras foram trituradas em sonicador ultra-sônico (Ultrasonic Processor) por dez segundos, mantendo-se o recipiente em gelo para evitar o aquecimento da amostra. Após este procedimento, as amostras foram centrifugadas (centrífuga Jouan) a 14.000 rpm, por 20 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e novamente estocados a –70° C, até o uso para dosagem de fatores neurotróficos e quantificação da proteína total tecidual.

Para a quantificação de fatores neurotróficos utilizou-se o método de ELISA (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”), tipo sanduíche, usando kits e protocolos da R & D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EUA) para ambos os fatores neurotróficos (BDNF e GDNF). A quantificação de proteína total nos tecidos foi realizada através do método colorimétrico de Bradford (1976). A concentração de BDNF e de GDNF no tecido foi expressa em pg do fator por mg de proteína total.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura na concentração de 5.6 µl/ml, diluído em PBS estéril, por uma noite, à temperatura

ambiente. As placas foram lavadas com PBS contendo 0.05% Tween 20 e incubadas com solução de bloqueio (PBS/BSA 1%) de sítios inespecíficos, durante uma hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e procedeu-se a adição das amostras de tecidos, em duplicata, previamente homogeneizadas e diluídas de forma a trazer os níveis de GDNF ou BDNF para valores constantes na curva padrão do sistema. Em cada placa, fez-se curva padrão da proteína quantificada, de acordo com o protocolo estabelecido. Poços sem a adição de amostras, contendo somente tampão diluente, foram também processados, para controle da técnica. As amostras permaneceram no processo de incubação por duas horas, em temperatura ambiente. Após lavagem, as placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente, com o anticorpo de detecção biotilado, na concentração de 5.6 $\mu\text{l/ml}$, dissolvido em PBS/BSA 1% e, a seguir, com estreptavidina conjugada a peroxidase (5 $\mu\text{l/ml}$), durante 20 minutos, no escuro. A revelação foi realizada pela adição de substrato para a peroxidase, durante 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de H_2SO_4 2N e a leitura dos resultados foi realizada no leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices, LLC, EUA), com comprimento de onda de 450 nm. Os valores obtidos foram analisados pelo programa SOFTmax Pro versão 3.1.1.

Para quantificação de proteína total nos sobrenadantes das amostras, as mesmas foram diluídas e distribuídas em placas de 96 poços e a elas foi acrescentada solução de Azul Cromassie G-250, preparada conforme protocolo citado (Bradford, 1976). As amostras foram acrescentadas em duplicatas e permaneceram no processo de incubação por 10 a 15 minutos, em temperatura ambiente, protegidas da luminosidade. A leitura dos resultados foi realizada no leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices, LLC, EUA), com comprimento de onda de 600 nm. Os valores obtidos foram analisados pelo programa SOFTmax Pro versão 3.1.1. Em cada placa, fez-se uma curva de calibração com BSA e poços sem a adição de amostras também foram analisados para controle de leitura inespecífica.

3.11 Confeção dos gráficos e análise estatística

Para análise estatística e confeção dos gráficos utilizou-se o programa GraphPad Prism versão 4.00 (GraphPad Software Incorporated).

Para todas as variáveis, aplicou-se primeiramente o teste de normalidade Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal das amostras. Após a confirmação de que os dados eram paramétricos, aplicou-se o teste teste t pareado para grupos dependentes ou teste t não pareado para grupos independentes (de acordo com o valor do coeficiente de variação). O valor de significância foi estabelecido em 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Desempenho físico de ratos durante a avaliação em esteira

A avaliação do desempenho físico foi realizada na sexta semana de vida dos animais jovens, enquanto os animais adultos foram avaliados durante sua 25ª semana de idade.

Os animais jovens permaneceram em movimento sobre a esteira durante 14 minutos e 26 segundos, em média, alcançando a velocidade máxima média de 15 m/min. Nesta velocidade, os ratos frequentemente apresentaram passos de corrida. Na avaliação do desempenho físico de animais adultos, estes estiveram em deslocamento por 4 minutos, em média, e apresentaram velocidade máxima média de 10 m/min.

Ao se calcular a velocidade da corrida em esteira dos animais jovens e adultos, correspondente a 50-60% do trabalho máximo realizado, obteve-se a distribuição percentual e frequência acumulada para cada velocidade em que os animais foram exercitados, apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição percentual de ratos jovens e adultos de acordo com a velocidade da corrida em esteira, calculada a partir da avaliação do desempenho físico.

Velocidade de corrida (m/min.)	Ratos jovens (%)	Frequência acumulada (%)	Ratos adultos (%)	Frequência acumulada (%)
0	50	50	53	53
10	-	-	47	100
11	30	80	-	
14	15	95	-	
15	5	100	-	
Total	100		100	

Este resultado indica, por meio da análise da frequência acumulada, que animais jovens demonstraram desempenho variado quando comparados aos animais adultos. Enquanto ratos jovens foram submetidos à corrida na esteira em velocidades entre 11 e 15 m/min., os ratos adultos se exercitaram a 10 m/min., de acordo com a avaliação individual do desempenho físico.

Os animais adultos foram utilizados somente para análise de fatores neurotróficos na porção ventral do mesencéfalo e *striatum*, uma hora ou três dias após a administração de 6-OHDA ou veículo.

Vale ressaltar novamente que os animais do grupo SED (sedentário) ou EX (exercitado) não foram submetidos a qualquer procedimento cirúrgico, enquanto animais SED SHAM e EX SHAM foram submetidos ao veículo da 6-OHDA e ratos SED 6-OHDA e EX 6-OHDA foram submetidos à lesão da SNpc pela neurotoxina catecolaminérgica 6-OHDA.

4.2 Parâmetros comportamentais motores são influenciados pelo exercício físico prévio à lesão por 6-OHDA em ratos jovens

4.2.1 Teste de impressão de pata (*Footprint test*): exercício físico prévio à lesão reduz a instabilidade postural dinâmica induzida pela lesão por 6-OHDA de ratos jovens durante o teste de impressão de pata

A análise de marcha dos ratos teve por objetivo verificar o padrão de caminhada por meio da visualização das impressões das patas dianteiras e baseou-se no número de passos, no comprimento da passada e no comprimento e largura do passo. As avaliações foram realizadas em dois dias de teste: o dia 1, ou teste do comportamento prévio à lesão e o dia 2, ou momento pós-lesão, o qual aconteceu três dias após a administração de 6-OHDA.

Os ratos SED, SED SHAM e SED 6-OHDA não apresentaram diferença significativa no número de passos, comprimento do passo e comprimento da passada (Fig. 11).

Os animais sedentários submetidos à lesão por 6-OHDA (SED 6-OHDA), entretanto, demonstraram instabilidade postural dinâmica evidenciada por maior largura do passo no dia 2 quando comparados ao resultado pré-lesão (dia 1) e quando comparados aos demais animais do grupo sedentário no dia 2 (SED e SED SHAM) (Fig. 11D). Ratos SED 6-OHDA ainda apresentaram maior base de suporte quando comparados a animais EX 6-OHDA (Fig. 11D vs. fig. 12D).

Por outro lado, animais EX, EX SHAM ou EX 6-OHDA não apresentaram diferença significativa no número de passos, no comprimento da passada, no comprimento do passo e nem na largura do passo (Fig. 12).

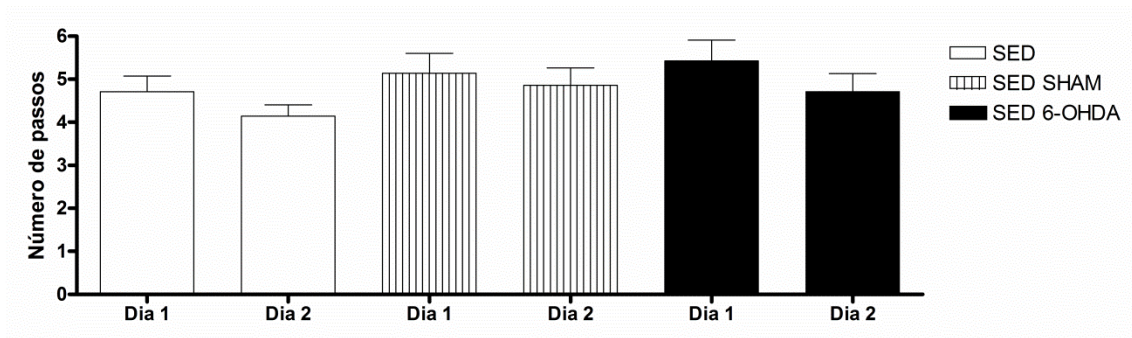
Estes resultados indicam que três semanas de exercício em esteira previamente à lesão por 6-OHDA foram capazes de impedir a instabilidade postural dinâmica durante a marcha, demonstrada por alargamento da base de suporte (aumento da largura do passo), vista em animais sedentários. Este fato possivelmente é devido à prática de exercício físico em esteira que, na velocidade usada, os ratos frequentemente apresentaram passos de corrida e nesta situação, a base de suporte encontra-se reduzida.

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da (s) variável (is) descrita (s) encontram-se nos *anexos I a IV*, páginas 128 a 131.

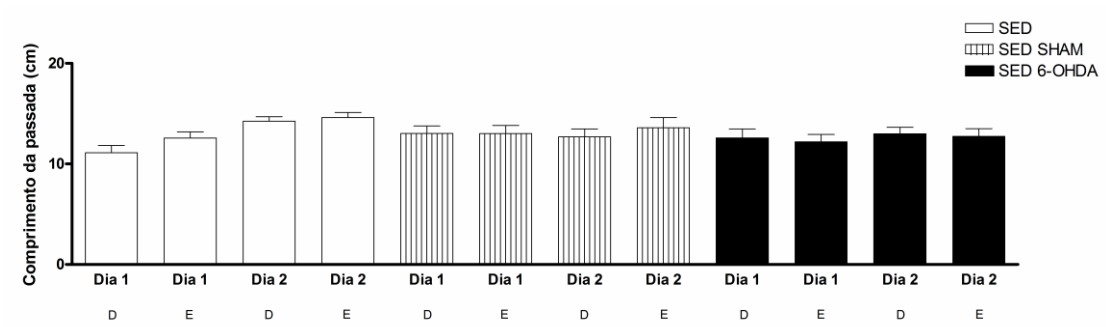
Figura 11. Lesão por 6-OHDA gera instabilidade postural dinâmica durante a marcha de ratos sedentários. Animais sedentários submetidos a 6-OHDA (dia 2) apresentam passos mais largos do que apresentavam antes da lesão (dia 1) e também mais largos que animais não lesados. (A) Número de passos dados sobre papel milimetrado no corredor de 40 cm de comprimento. (B) Comprimento da passada. (C) Comprimento do passo. (D) Largura do passo. D: direito. E: esquerdo. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$ (vs. dia 1 – análise intragrupo, vs. dia 2 – animais – SED, SED SHAM e EX 6-OHDA).

Figura 11:

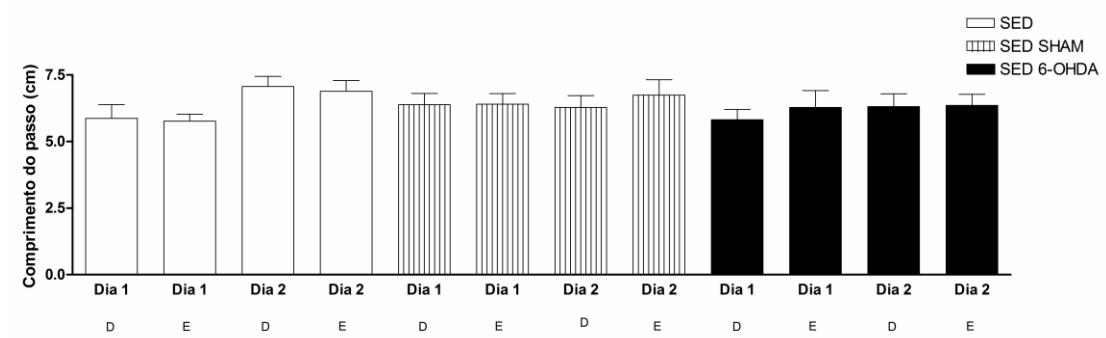
A



B



C



D

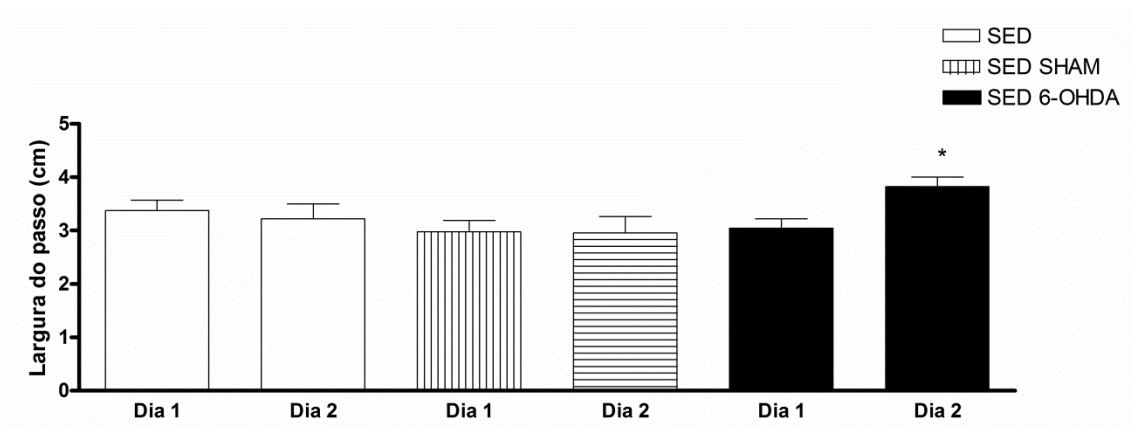
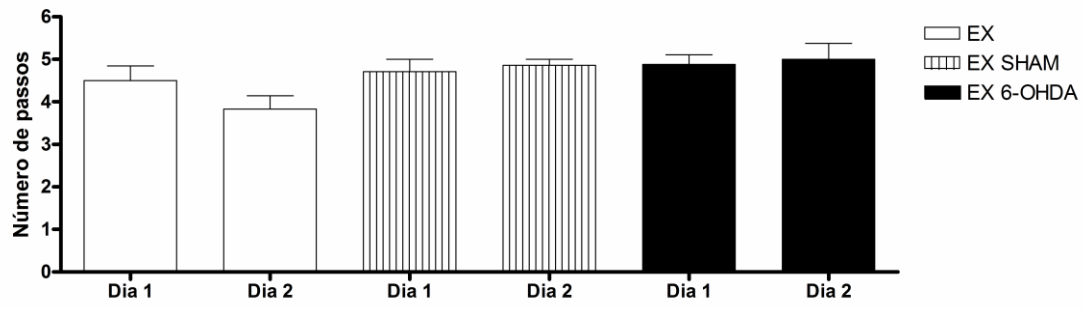


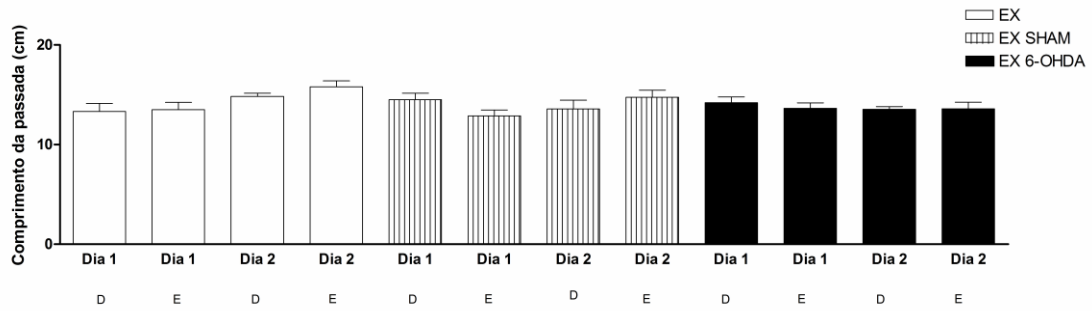
Figura 12. Exercício prévio em esteira impede instabilidade postural dinâmica durante a marcha de ratos. Animais exercitados submetidos a 6-OHDA (dia 2) apresentam a mesma largura de passos do que apresentavam antes da lesão (dia 1) e também de igual largura que animais não lesados. (A) Número de passos dados sobre papel milimetrado no corredor de 40 cm de comprimento. (B) Comprimento da passada. (C) Comprimento do passo. (D) Largura do passo. D: direito. E: esquerdo. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.

Figura 12:

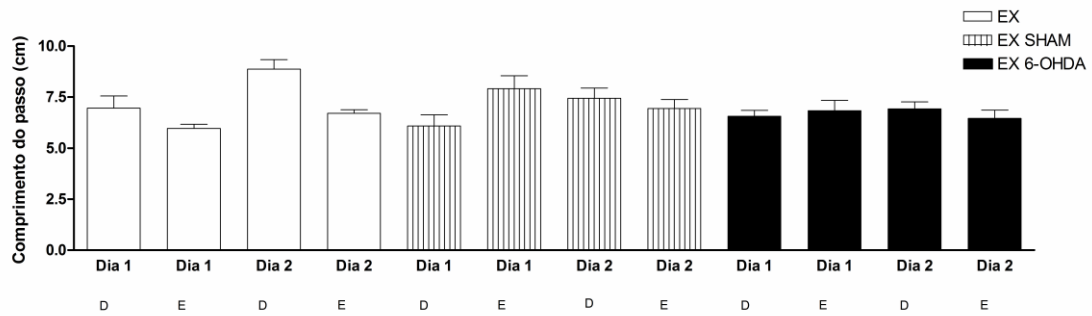
A



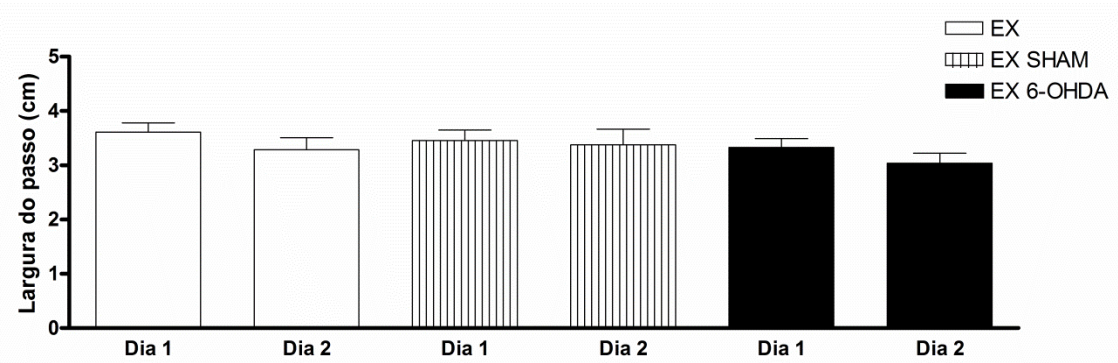
B



C



D



4.2.2 Teste na trave de equilíbrio (*Beam balance test*): a lesão não altera o equilíbrio estático e dinâmico de ratos exercitados

A análise do desempenho dos ratos na trave de equilíbrio baseou-se no tempo de permanência ou latência sobre o aparato de teste, avaliado em dois dias. O objetivo deste teste foi o de verificar a permanência dos animais em equilíbrio estático ou dinâmico durante 60 segundos sobre uma base de suporte reduzida.

O dia 1 indicou resultados pré-lesão. Animais não lesados (SED e EX) foram avaliados também uma 2ª vez. O dia 2, somente nos grupos SED 6-OHDA e EX 6-OHDA, caracterizou-se como momento pós-lesão, e correspondeu ao terceiro dia após a administração de 6-OHDA.

Não houve diferença significativa na latência sobre o aparato da trave de equilíbrio nos grupos de animais SED (não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico), SED SHAM (submetidos ao veículo da 6-OHDA), ou SED 6-OHDA (submetidos a 6-OHDA) (Fig. 13A).

A figura 13B indica que animais dos grupos EX, EX SHAM e EX 6-OHDA também não apresentaram diferença significativa nos resultados entre dia 1 e 2 (Fig. 13B).

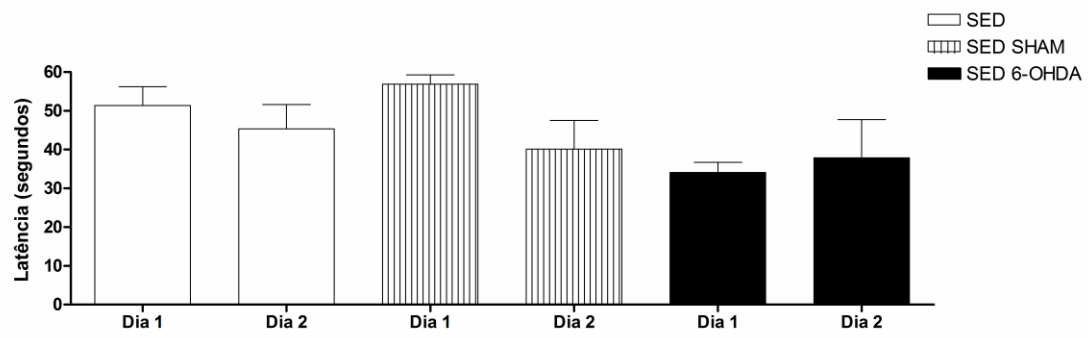
Quando se avaliou apenas o dia 2, não houve diferença significativa entre todos os grupos, porém, houve uma tendência no grupo EX 6-OHDA em permanecer um tempo maior sobre o aparato de teste (Fig. 13C).

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da (s) variável (is) descrita (s) encontram-se no *anexo V*, página 132.

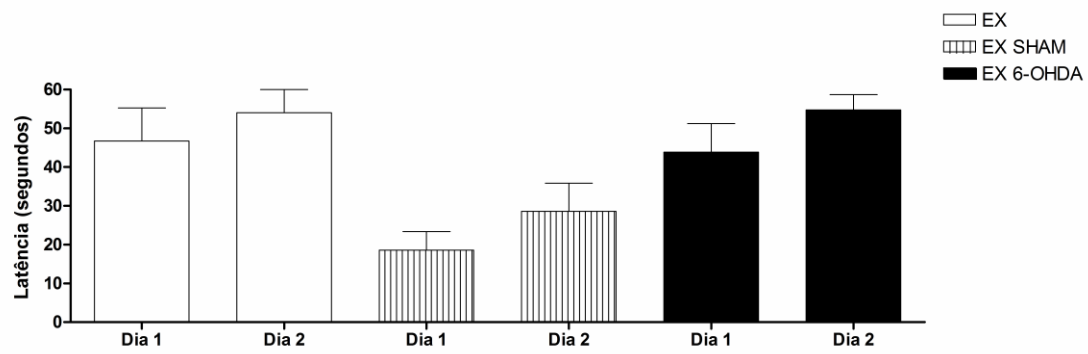
Figura 13. Desempenho de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à lesão por 6-OHDA ou seu veículo na trave de equilíbrio. Latência não é modificada pela lesão por exercício prévio ou exposição a 6-OHDA. (A) Latência (tempo de permanência no total de 60 segundos) de ratos sedentários (SED). (B) Latência de ratos exercitados (EX). (C) Latência de ratos sedentários ou exercitados, submetidos ou não à lesão por 6-OHDA no dia 2. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.

Figura 13:

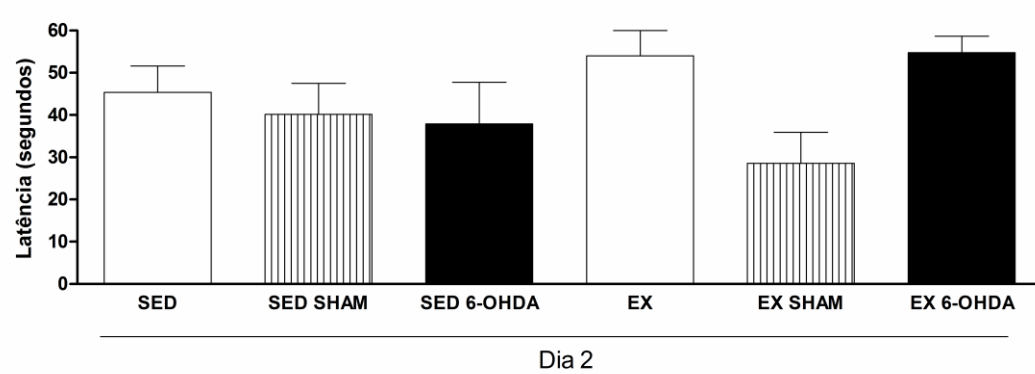
A



B



C



4.2.3 Teste na grade vertical (*Vertical grid test*): ratos sedentários submetidos à lesão por 6-OHDA despenderam mais tempo durante o teste quando comparados a ratos previamente exercitados e lesados

O equilíbrio dinâmico também foi avaliado na grade vertical, pois este teste adicionou o componente de movimento do animal contra a gravidade, exigindo maior controle e coordenação motora. O objetivo deste teste foi verificar a capacidade do rato em girar da posição inicial, com o focinho direcionado para cima, para a posição de descida, com o focinho direcionado para baixo e descer do aparato, em menor tempo possível, sem deslizos ou quedas.

A análise do desempenho dos ratos na grade vertical baseou-se nos seguintes parâmetros: tempo para girar no aparato, o tempo gasto para descer e o somatório destes dois fatores, o tempo total despendido no teste. O teste foi avaliado em dois dias. O dia 1 indicou resultados pré-lesão. Animais não lesados (SED e EX) foram avaliados também uma 2ª vez. O dia 2, somente nos grupos SED 6-OHDA e EX 6-OHDA, caracterizou-se como momento pós-lesão, e correspondeu ao terceiro dia após a administração de 6-OHDA.

O teste na grade vertical demonstrou diferenças no comportamento motor dos animais sedentários (Fig. 14) e dos ratos exercitados (Fig. 15).

Nos animais SED, SED SHAM e SED 6-OHDA não houve diferença significativa no tempo para girar. Pode-se observar que após a injeção por 6-OHDA, os ratos do grupo SED 6-OHDA apresentaram tendência em gastar mais tempo para descer. Estes animais, SED 6-OHDA apresentaram maior tempo total após a lesão (dia 2) quando comparados ao comportamento pré-lesão (dias 1), indicando instabilidade postural.

A análise comportamental na grade vertical dos animais exercitados demonstrou que eles foram capazes de manter o tempo gasto para girar, descer e o tempo total despendido na realização do teste, indicando que o exercício físico prévio foi capaz de prevenir a dificuldade motora em realizar o teste que exigiu força e coordenação motora contra gravidade.

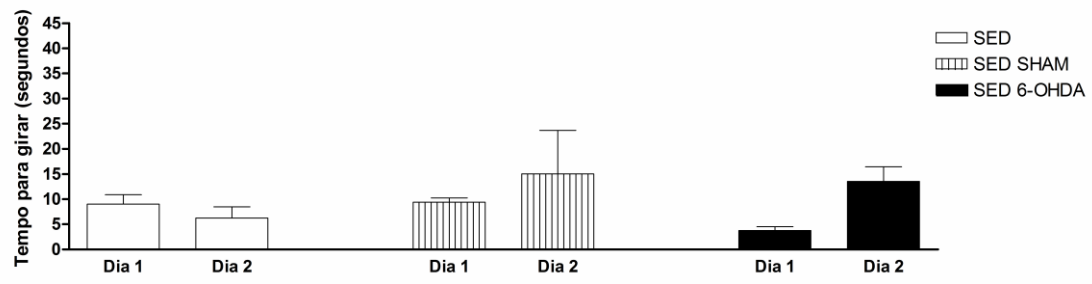
Comparando-se o comportamento na grade vertical no dia 2, os animais sedentários submetidos a 6-OHDA (SED 6-OHDA) gastaram mais tempo total durante o teste quando comparados aos ratos EX 6-OHDA (Fig. 16).

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da (s) variável (is) descrita (s) encontram-se nos *anexos VI a VIII*, páginas 133 a 135.

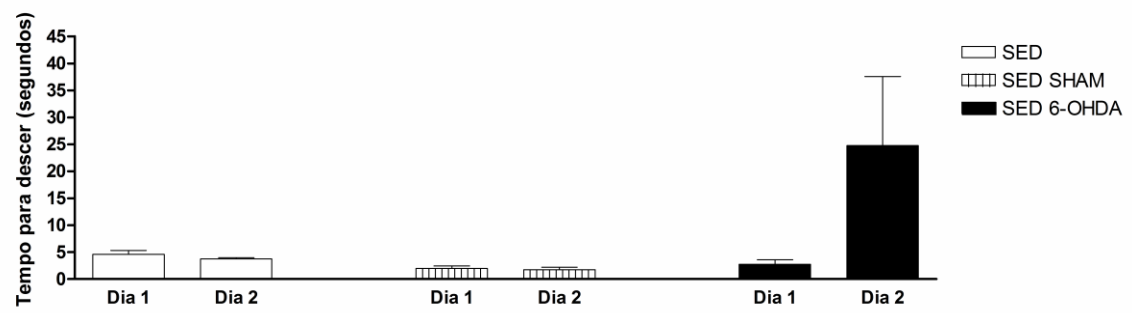
Figura 14. Desempenho de ratos jovens sedentários no teste na grade vertical. Ratos sedentários submetidos a 6-OHDA gastam mais tempo total para realizar o teste do que animais não lesados (A) Tempo para girar. (B) Tempo para descer. (C) Tempo total. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$ (vs. dia 1 – análise intragrupo).

Figura 14:

A



B



C

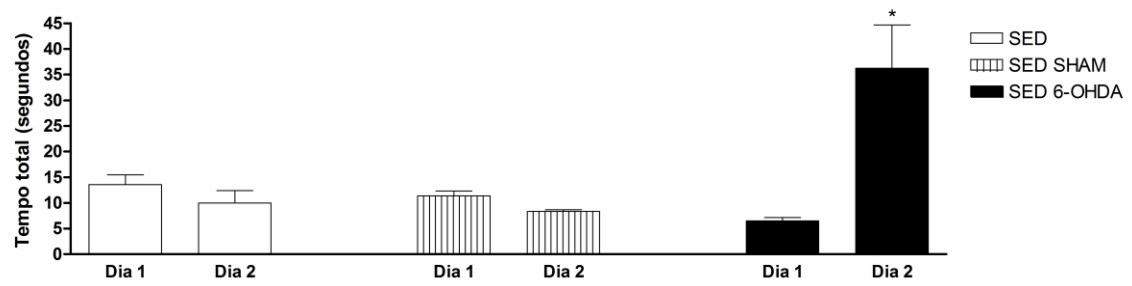
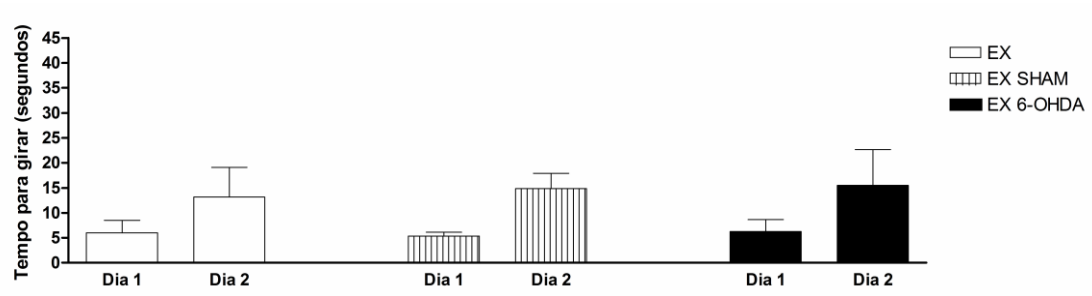


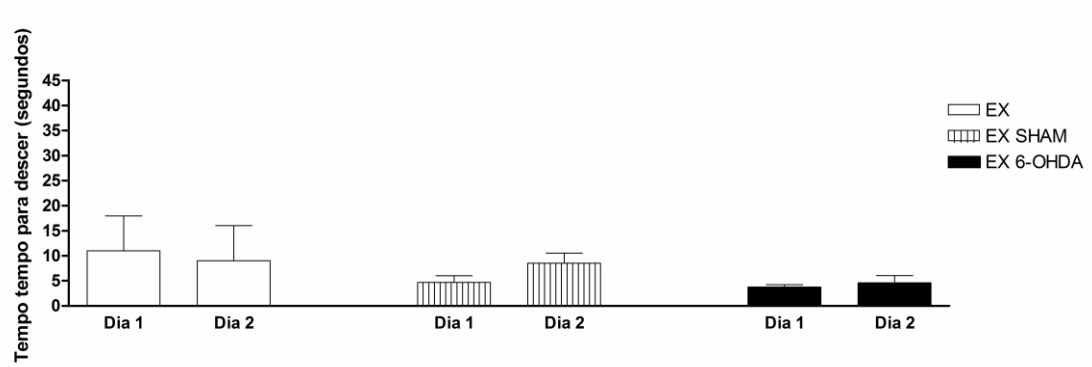
Figura 15. Desempenho de ratos jovens exercitados no teste na grade vertical. Ratos exercitados não exibem dificuldade nos movimentos coordenados contra a gravidade, demonstrada pelo aumento do tempo total gasto no teste. (A) Tempo para girar. (B) Tempo para descer. (C) Tempo total. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.

Figura 15:

A



B



C

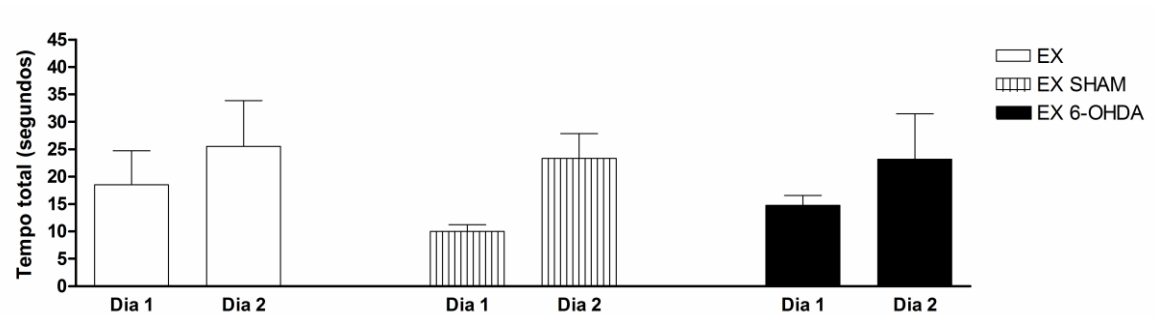
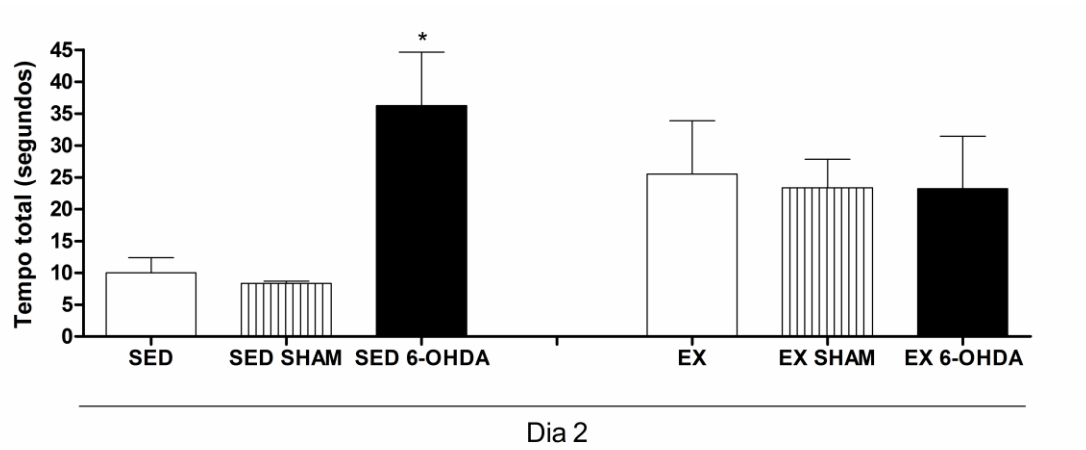


Figura 16. Desempenho na grade vertical de ratos jovens submetidos à lesão por 6-OHDA, sedentários ou previamente exercitados. Ratos sedentários e lesados (SED 6-OHDA) gastam mais tempo para terminar o teste quando comparados a ratos exercitados e lesados (EX 6-OHDA). Tempo total para realizar o teste. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student. * = $p < 0.05$ (vs. EX 6-OHDA).

Figura 16:



4.2.4 Teste no campo aberto (*Open field test*): exercício prévio à lesão por 6-OHDA não modifica comportamento motor exploratório e movimentação espontânea

A análise do comportamento exploratório e da movimentação espontânea foi avaliada no teste no campo aberto durante cinco minutos em dois dias de teste, o dia 1, ou análise pré-lesão e o dia 2, que se caracterizou como avaliação pós-lesão e que ocorreu três dias após a injeção de 6-OHDA.

Os parâmetros analisados foram o número de quadrantes visitados, o número de vezes em que o animal se apoiou somente nas patas traseiras (*rearing*) e o tempo gasto em rituais de higiene da cabeça e vibrissas e corpo (*grooming*).

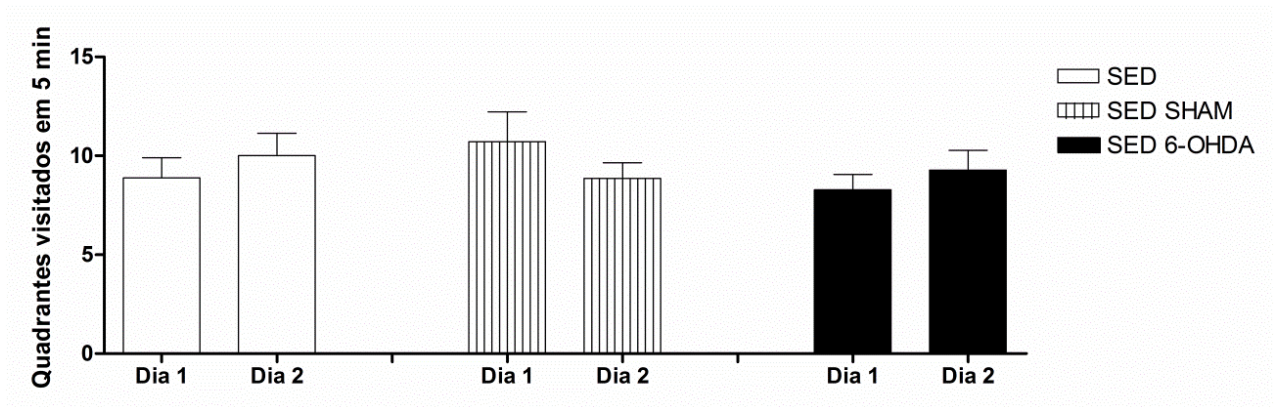
Não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados em todos os grupos de animais SED, SED SHAM e SED 6-OHDA (Fig. 17), assim como nos ratos EX, EX SHAM e EX 6-OHDA (Fig. 18).

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da (s) variável (is) descrita (s) encontram-se nos anexos IX a XI, páginas 136 a 138.

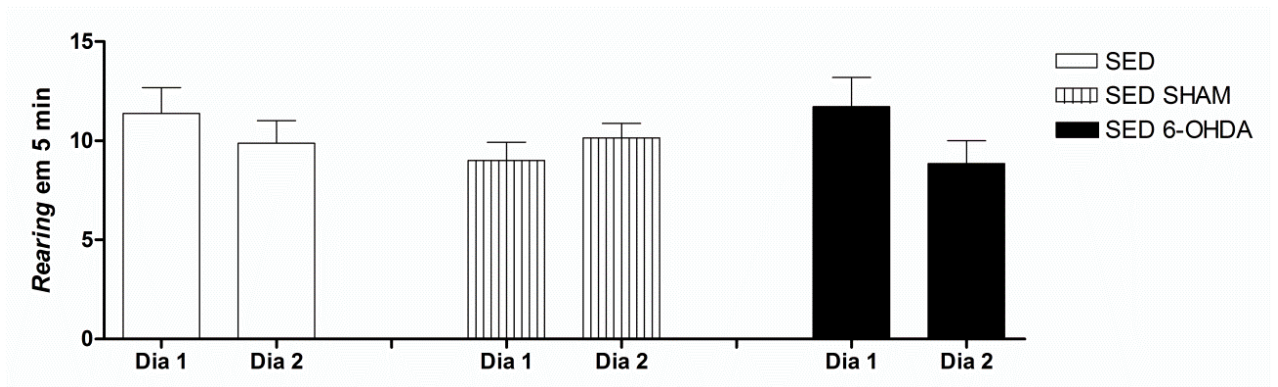
Figura 17. Desempenho motor exploratório e movimentação espontânea de ratos sedentários no teste no campo aberto. Independentemente de serem exercitados ou não e submetidos a lesão ou não, não houve alteração nas respostas durante o teste no campo aberto. (A) Número de quadrantes visitados em 5 minutos. (B) Número de *rearing* (número de vezes em que o animal se apoiou somente nas patas traseiras). (C) Tempo gasto em *grooming*. (rituais de higiene da cabeça, vibrissas, tronco, genitais e rabo). Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.

Figura 17:

A



B



C

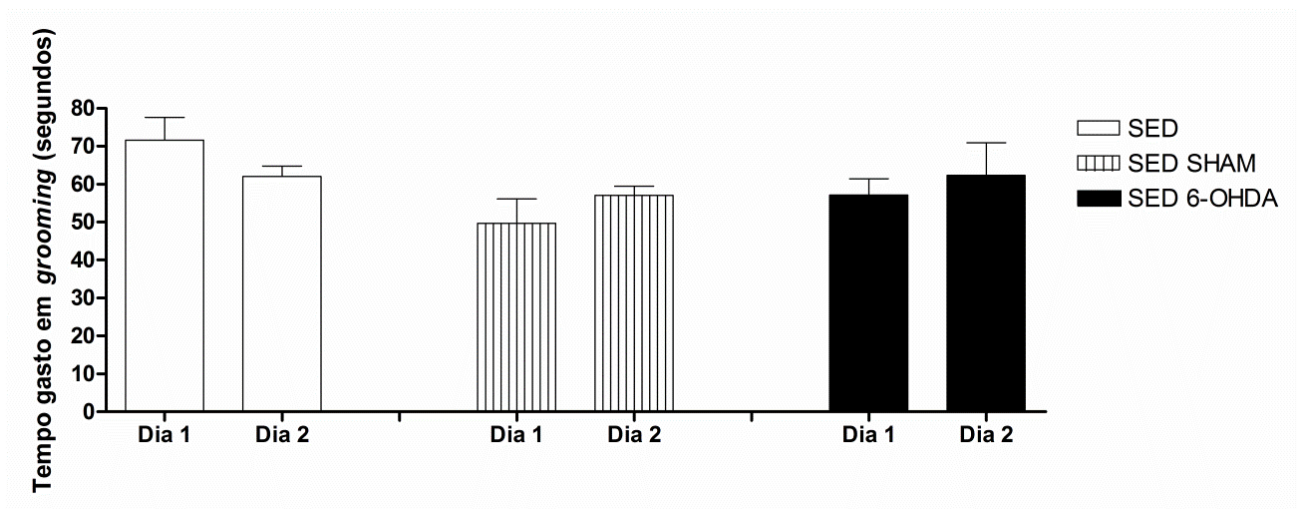
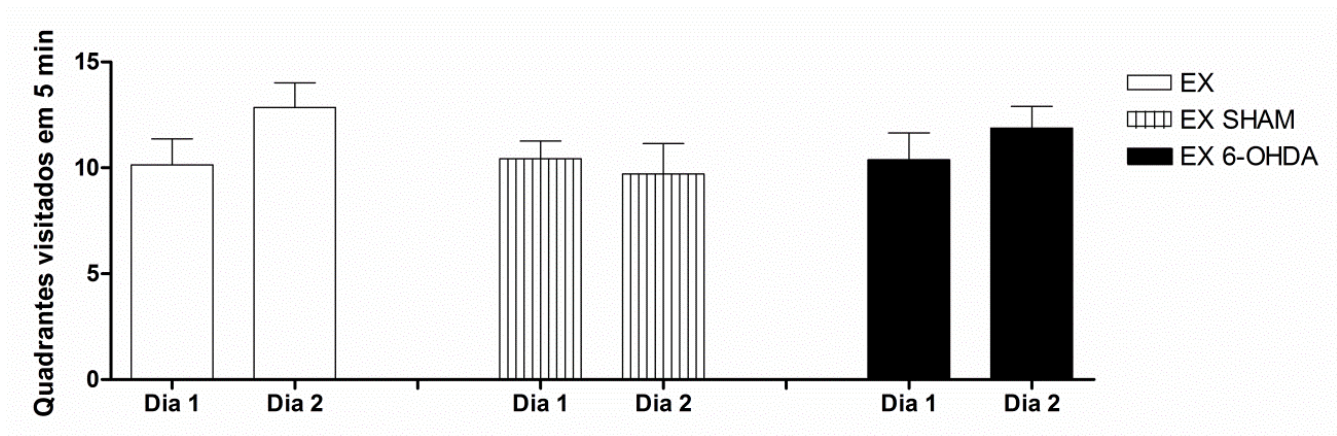


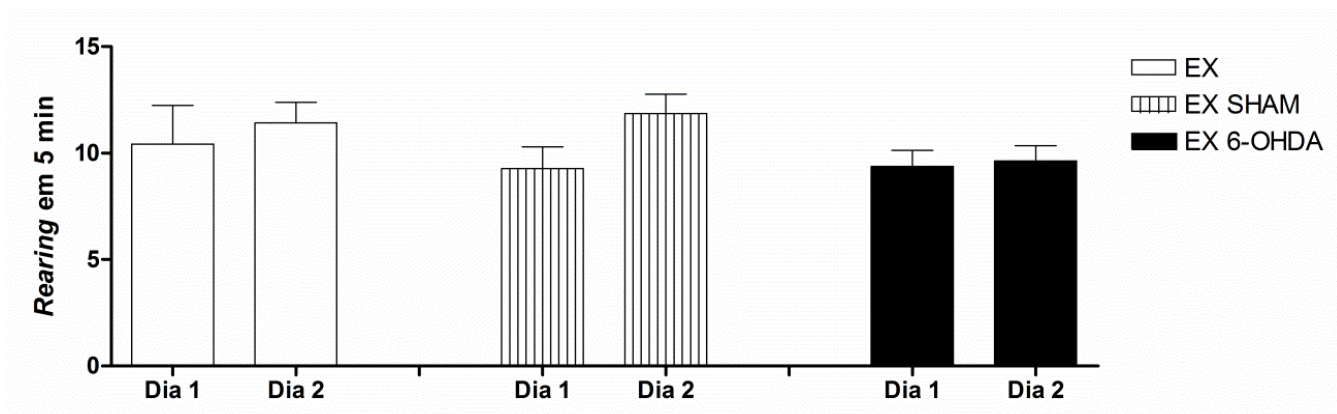
Figura 18: Desempenho motor exploratório e movimentação espontânea de ratos sedentários no teste no campo aberto. Independentemente de serem exercitados ou não e submetidos a lesão ou não, não houve alteração nas respostas durante o teste no campo aberto. (A) Número de quadrantes visitados em 5 minutos. (B) Número de *rearing* (número de vezes em que o animal se apoiou somente nas patas traseiras). (C) Tempo gasto em *grooming*. (rituais de higiene da cabeça e vibrissas). Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.

Figura 18:

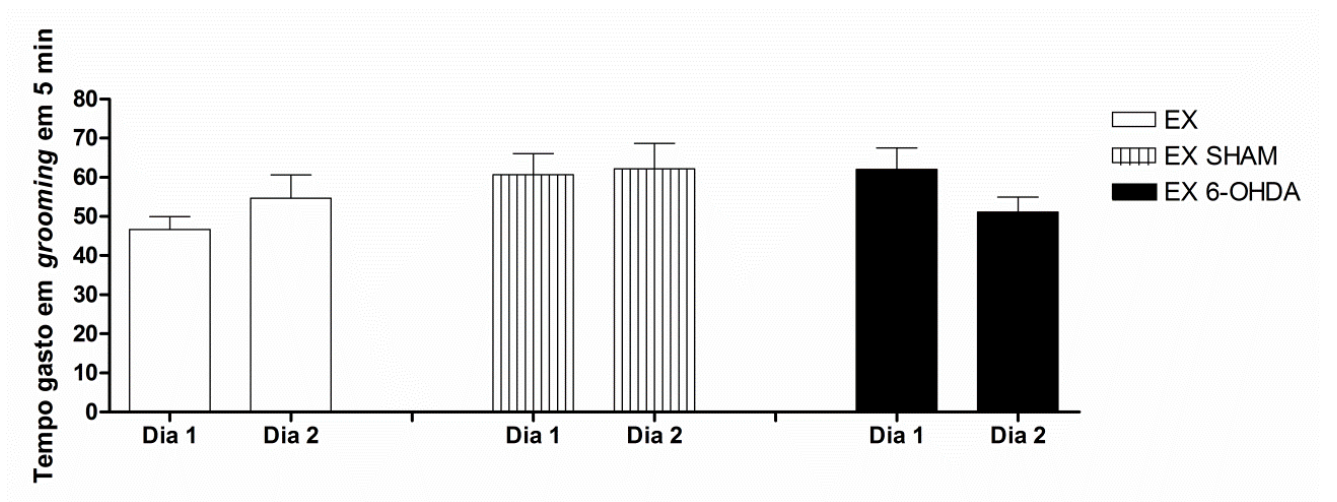
A



B



C



4.3 Exercício prévio em esteira não impede a morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra do mesencéfalo

A técnica imunohistoquímica para identificação de neurônios dopaminérgicos TH-positivos na SNpc evidenciou intensa marcação dos corpos e prolongamentos neuronais em ambos os lados, esquerdo e direito, na SNpc dos animais do grupo SED (não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico) (Fig. 19A, B), SED SHAM (submetidos ao veículo da 6-OHDA) (Fig. 19C,D) assim como nos animais EX (Fig. 19G, H) e EX SHAM (Fig. 19I, J).

Três dias após a lesão por 6-OHDA, a análise imunohistoquímica e análise quantitativa, por meio de contagem neuronal dos neurônios TH-positivos na SNpc dos animais, revelaram que, independentemente de serem sedentários (SED 6-OHDA) (Fig. 19E, F) ou exercitados (EX 6-OHDA) (Fig. 19K, L), a injeção de 6-OHDA promoveu intensa redução da imunomarcação dos neurônios TH-positivos somente na SNpc direita, local da injeção (Fig. 19F, L).

Quando se comparou a densidade neuronal entre os lados direitos da SNpc de ratos SED 6-OHDA e EX 6-OHDA, não houve diferença significativa entre estes resultados (Fig. 20).

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da (s) variável (is) descrita (s) encontram-se no *anexo XII*, página 139.

Figura 19. Fotografias representativas da substância negra do mesencéfalo *pars compacta* (SNpc) submetidas à imunomarcagem específica para TH. (A-F): Ratos jovens sedentários (SED). (G-L): Ratos jovens exercitados (EX). Ratos SED (A, B), SED SHAM (C, D), EX (G, H) e EX SHAM (I, J) apresentaram intensa imunomarcagem dos corpos e prolongamentos neuronais bilateramente na SNpc. Três dias após a injeção de 6-OHDA, a imunomarcagem dos corpos e prolongamentos neuronais foi drasticamente reduzida somente no lado direito dos animais SED 6-OHDA (F) e EX 6-OHDA (L) submetidos à lesão por 6-OHDA. Seta: corpo neuronal. Cabeça de seta: prolongamento neuronal. *: vaso sanguíneo.

Figura 19:

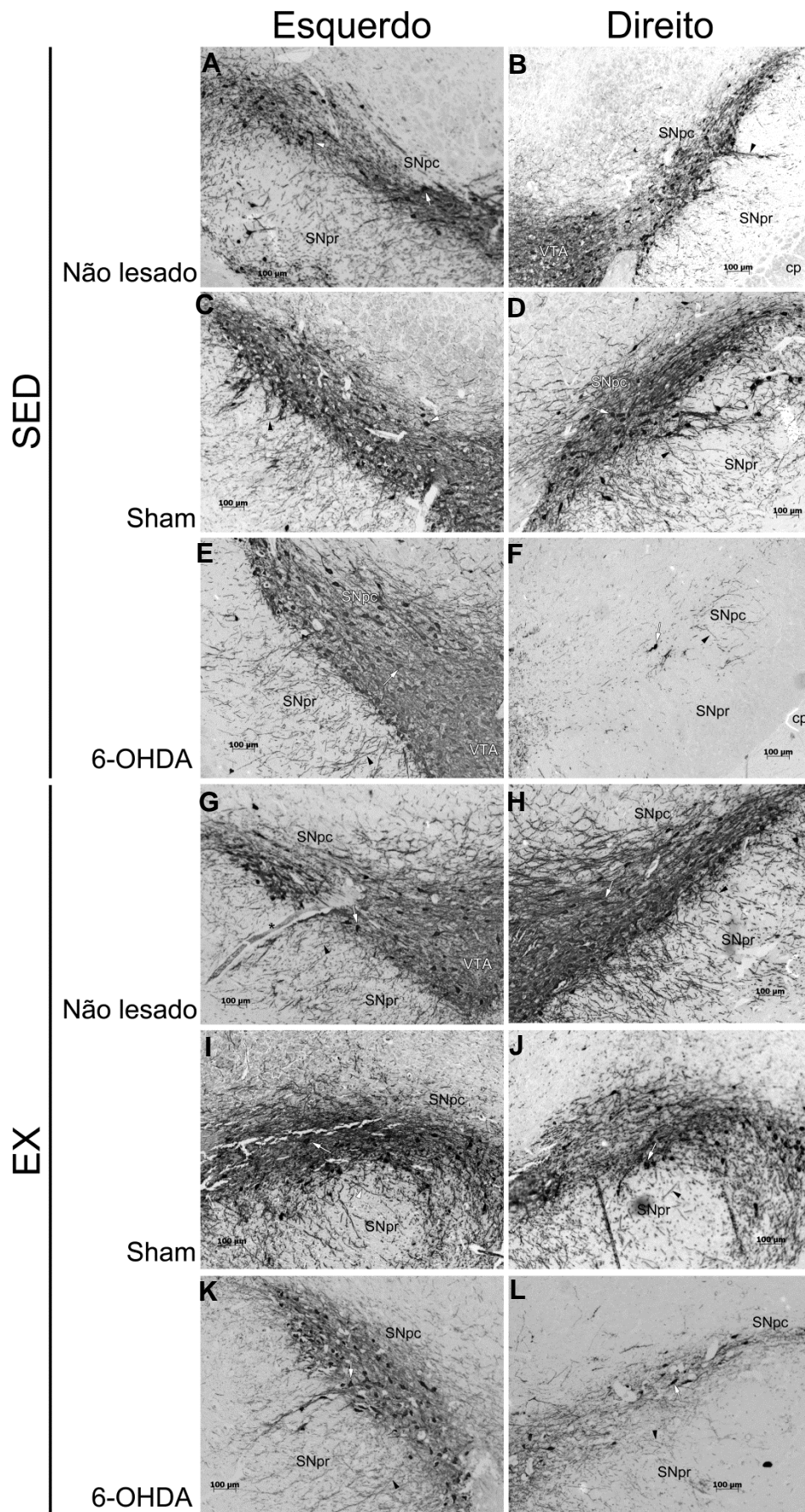
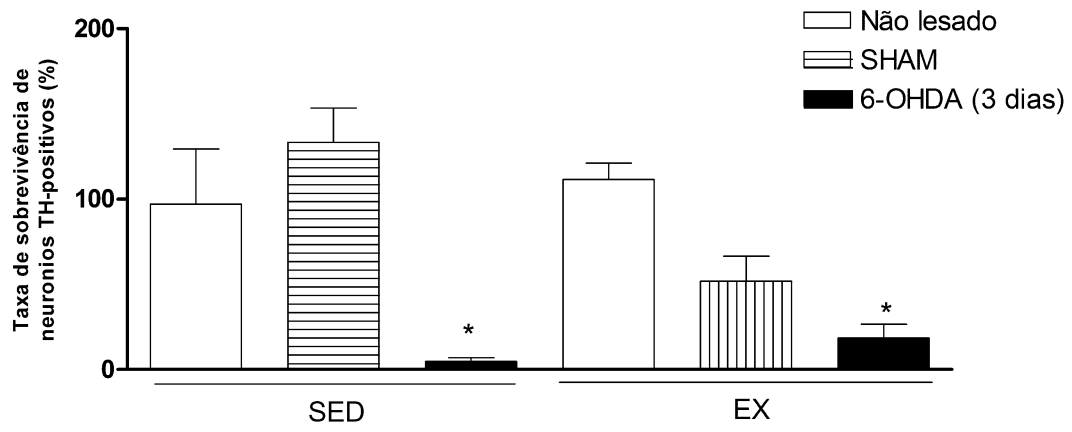


Figura 20. Exercício prévio em esteira não foi capaz de prevenir a morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra do mesencéfalo. A densidade dos neurônios TH-positivos em ratos sedentários e exercitados, lesados ou não. A análise imunohistoquímica foi realizada três dias após a injeção de 6-OHDA foi calculada após análise quantitativa por contagem dos corpos neuronais. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.* $p < 0,05$.

Figura 20:



4.4 Exercício físico prévio em esteira ou lesão da SNpc não modificou a densidade de astrócitos na porção ventral do mesencéfalo

A técnica imunohistoquímica e análise quantitativa dos astrócitos GFAP-positivos na porção ventral do mesencéfalo revelaram que não houve diferença entre os grupos de animais após a lesão por 6-OHDA, sejam eles sedentários ou exercitados, submetidos ou não à injeção de 6-OHDA (Fig. 21 e 22). A observação da densidade de astrócitos GFAP-positivos na porção ventral do mesencéfalo revelou tendência a maior número destas células por área em animais EX e EX 6-OHDA quando comparados aos SED e SED 6-OHDA.

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da (s) variável (is) descrita (s) encontram-se no *anexo XIII*, página 139.

Figura 21. Fotografias representativas da porção ventral do mesencéfalo submetida à imunomarcagem específica para *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP). (A-F): Ratos jovens sedentários (SED). (G-L): Ratos jovens exercitados (EX). Não houve diferença na densidade de imunomarcagem para GFAP entre os ratos SED (não lesados) (A, B), SED SHAM (C, D), ou EX (não lesados) (G, H), EX SHAM (I, J), e animais submetidos a 6-OHDA, sedentários (E, F) e exercitados (K, L).

Figura 21:

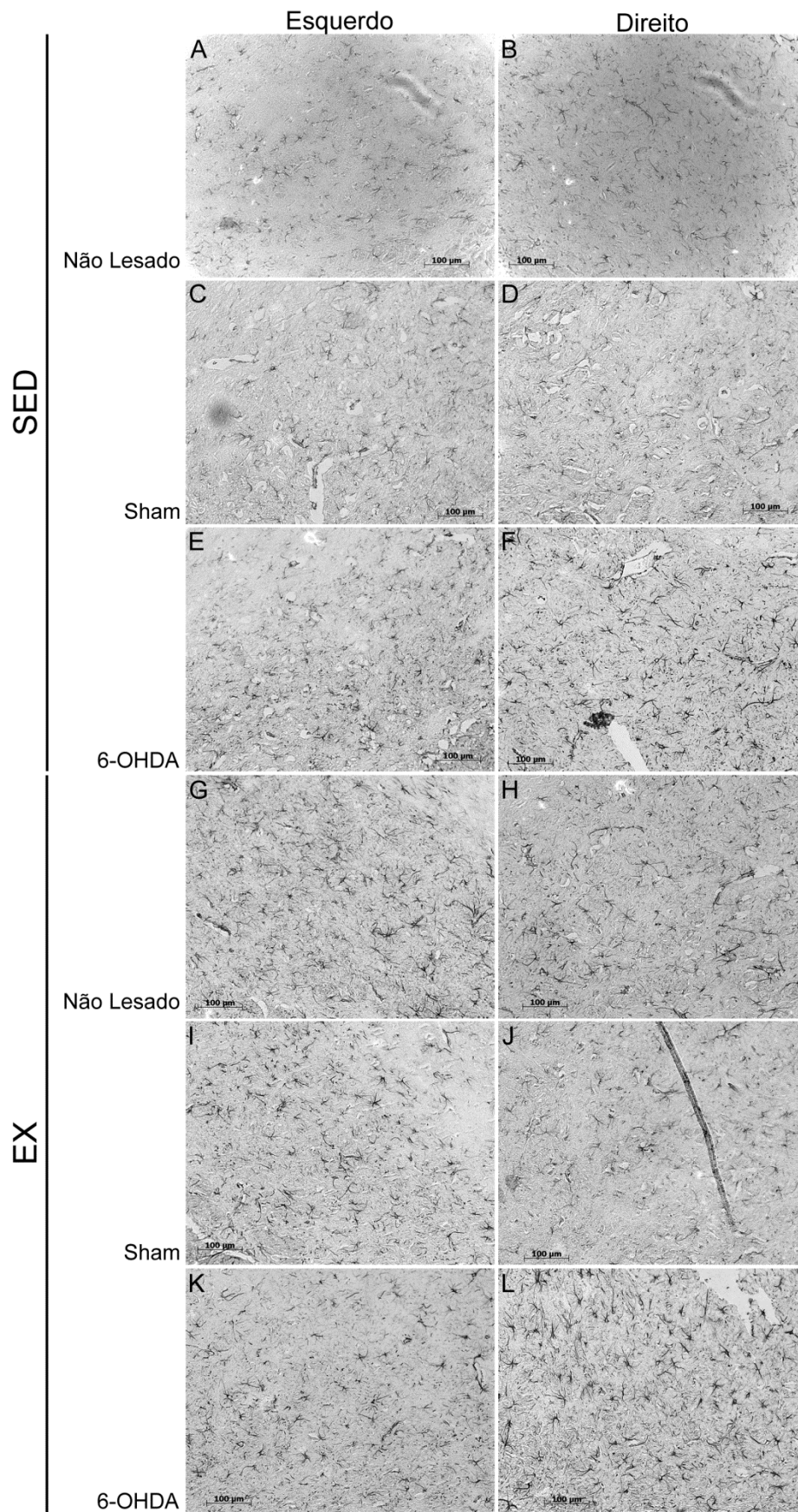
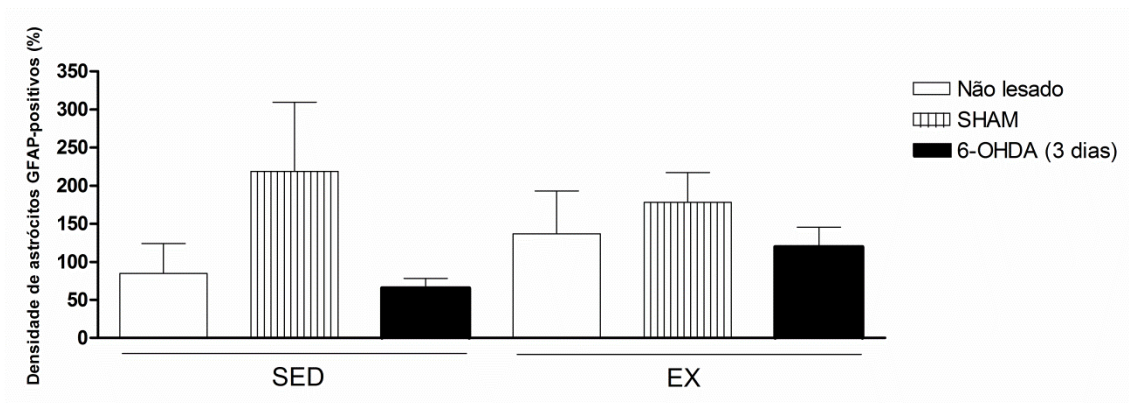


Figura 22. Exercício prévio em esteira ou lesão não foi capaz de modificar a densidade de astrócitos GFAP-positivos na porção ventral do mesencéfalo. A densidade de células GFAP-positivas foi analisada em amostras da porção ventral do mesencéfalo de ratos sedentários e exercitados submetidos ou não à injeção de 6-OHDA. As amostras foram coletadas três dias após injeção de 6-OHDA. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.

Figura 22:



4.5 *Dosagem dos níveis teciduais de fatores neurotróficos*

4.5.1 Efeito do exercício físico prévio em esteira sobre os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo e *striatum* de ratos jovens

Uma hora após a administração de 6-OHDA não houve alteração dos níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo de ratos jovens sedentários (SED 6-OHDA 1h) quando comparados aos animais não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico (SED) ou a aqueles submetidos ao veículo da droga (SED SHAM 1h) (Fig. 23A).

Três dias após a injeção, a 6-OHDA gerou em ratos jovens sedentários (SED 6-OHDA 3d) redução bilateral dos níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo quando comparados aos animais SED e SED SHAM 3d (Fig. 23A).

O exercício físico (EX) por si só não modificou os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo de ratos jovens, mas impediu a queda dos mesmos uma hora ou três dias após a lesão da SNpc direita (Fig. 23B).

No *striatum* de ratos jovens SED 6-OHDA 1h, a lesão da SNpc direita por 6-OHDA ocasionou aumento dos níveis de GDNF bilateralmente uma hora após a lesão, enquanto três dias após a lesão estes níveis retornaram aos valores apresentados por animais SED (Fig. 23C).

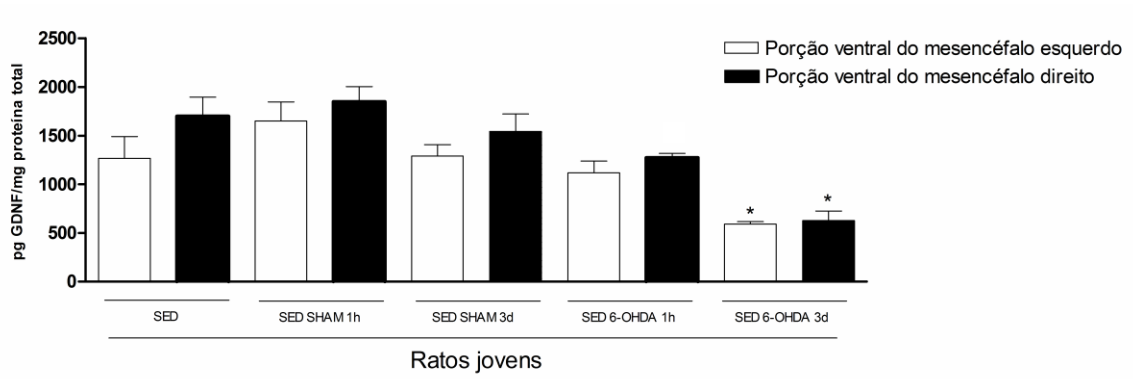
No *striatum* de ratos jovens previamente exercitados e submetidos à administração de 6-OHDA houve elevação bilateral dos níveis de GDNF uma hora (EX 6-OHDA 1h) e três dias (EX 6-OHDA 3d) após a lesão quando comparados a animais SED. Animais EX SHAM 1 h também apresentaram aumento dos níveis deste fator neurotrófico, mas três dias depois, eles já haviam retornado a valores controles (Fig. 23D).

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da (s) variável (is) descrita (s) encontram-se nos *anexos XIV e XV*, páginas 140 e 141.

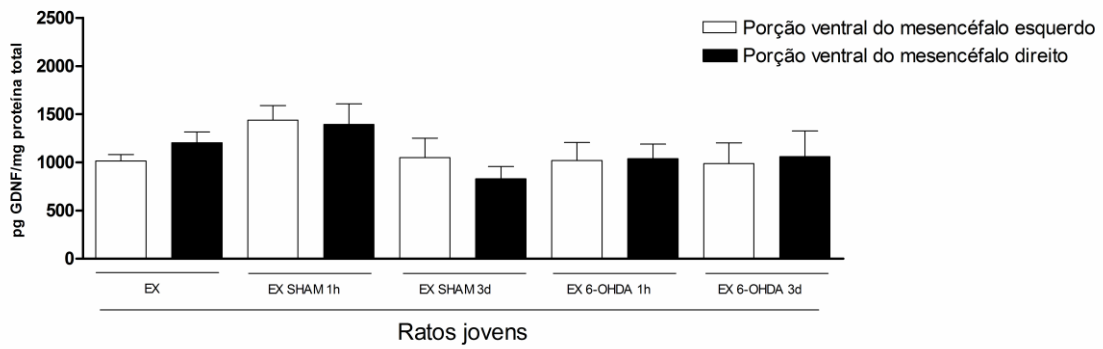
Figura 23: Efeito do exercício físico em esteira previamente a lesão por 6-OHDA sobre os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo (A e B) e *striatum* (C e D) de ratos jovens. Os níveis de GDNF foram expressos em pg GDNF/mg proteína total. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.* = $p < 0,05$ vs. mesmo lado do grupo SED (sedentário não submetido a qualquer procedimento cirúrgico).

Figura 23:

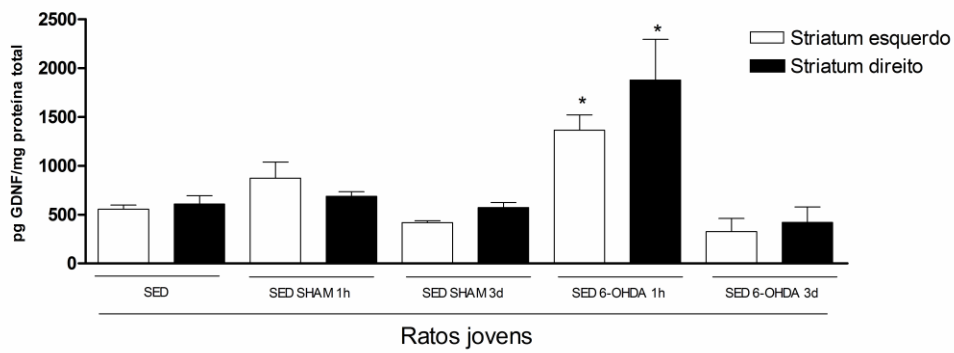
A



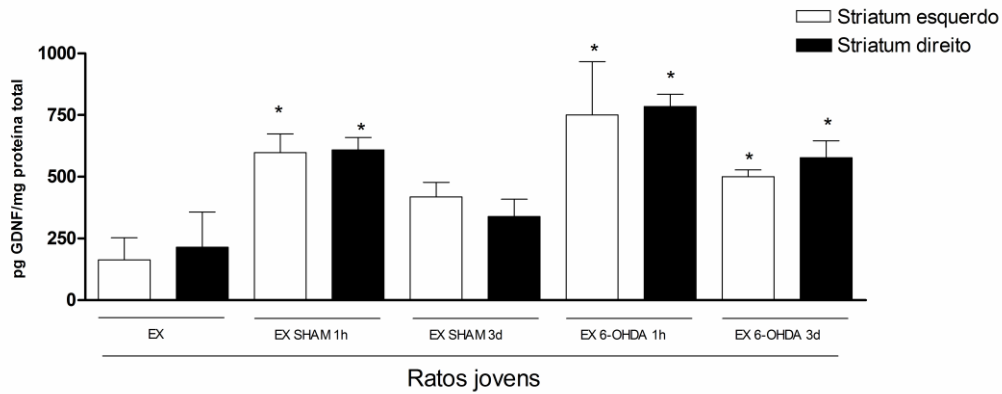
B



C



D



4.5.2 Efeito do exercício físico prévio em esteira sobre os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo e *striatum* de ratos adultos

Em ratos adultos, a lesão por 6-OHDA reduziu os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo bilateralmente, tanto uma hora (SED 6-OHDA 1h) quanto três dias (SED 6-OHDA 3d) após a administração de 6-OHDA. Em ratos exercitados não houve esta redução.

Novamente, o exercício por si só não foi capaz de modificar os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo de ratos adultos.

Não houve diferença entre os animais SED, SED SHAM 1h e SED SHAM 3d (Fig 24C).

No *striatum* dos ratos adultos, não houve diferença significativa dos níveis de GDNF quando se comparou os grupos de animais SED, SED SHAM 1h, SED SHAM 3d, SED 6-OHDA 1 h e SED 6-OHDA 3d (Fig. 24C).

Ratos adultos previamente exercitados e submetidos a 6-OHDA apresentaram níveis mais elevados de GDNF no *striatum* esquerdo, uma hora e três dias após a lesão da SNpc, principal eferência motora da SNpc (Fig 24D).

Não houve diferença significativa entre animais EX, EX SHAM 1h e EX SHAM 3d.

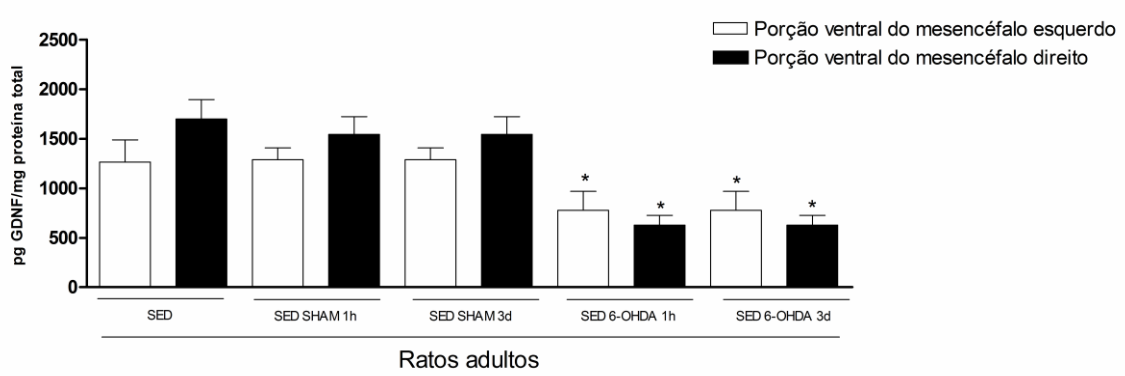
O exercício por si só (EX) não modificou os níveis deste fator no *striatum* de ratos adultos quando comparados a animais SED (Fig. 24D).

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da (s) variável (is) descrita (s) encontram-se nos *anexos XVI e XVII*, páginas 142 e 143.

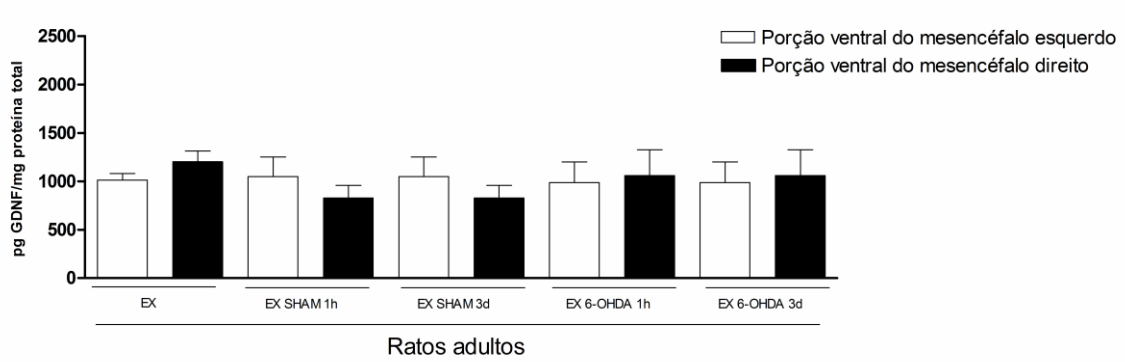
Figura 24: Efeito do exercício físico em esteira previamente a lesão por 6-OHDA sobre os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo (A e B) e *striatum* (C e D) de ratos adultos. Os níveis de GDNF foram expressos em pg GDNF/mg proteína total. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.* = $p < 0,05$ vs. mesmo lado do grupo SED (sedentário não submetido a qualquer procedimento cirúrgico).

Figura 24:

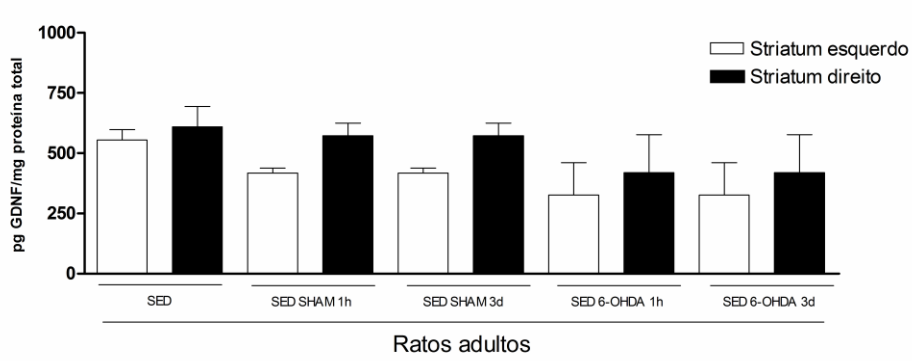
A



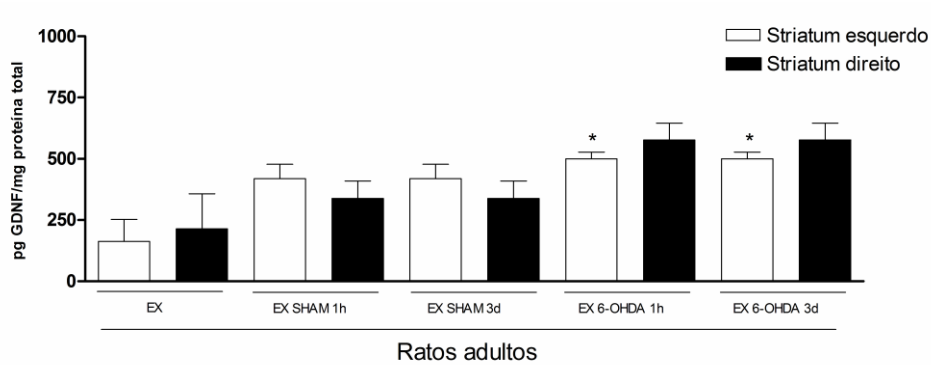
B



C



D



4.5.3 Efeito do exercício físico prévio em esteira sobre os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo e *striatum* de ratos jovens

Uma hora após a lesão (SED 6-OHDA 1h), houve redução dos níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo bilateralmente quando comparados aos níveis de ratos SED (sedentários e não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico). Três dias após a lesão (SED 6-OHDA 3d) os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo direito retornaram aos valores semelhantes aos vistos nos animais SED. Animais SED SHAM 1h também apresentaram redução dos níveis de BDNF quando comparados a animais SED, mas três dias após a administração do veículo da droga, estes valores retornaram a valores controles (Fig. 25A).

Ratos exercitados apresentaram também uma redução bilateral dos níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo uma hora após a lesão (EX 6-OHDA 1 h) quando comparados a ratos EX (previamente exercitados, mas não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico). Três dias após lesão, os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo direito retornaram aos valores semelhantes aos vistos nos animais não lesados e exercitados (EX).

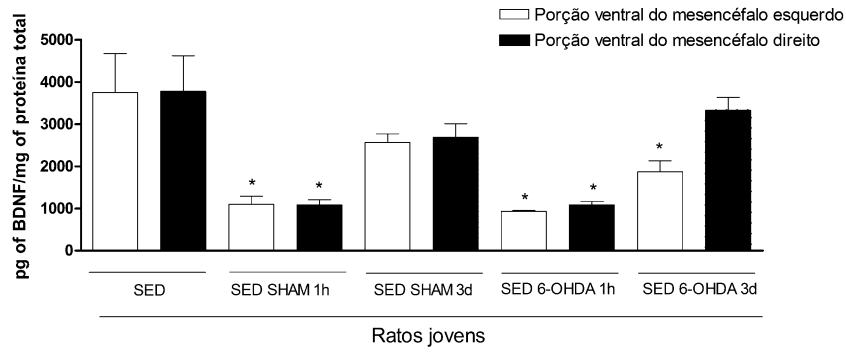
No *striatum* de animais jovens sedentários, não houve diferença nos níveis de BDNF quando se comparou os grupos SED, SED SHAM 1h, SED SHAM 3d, SED 6-OHDA 1h e SED 6-OHDA 3d. Analisando-se animais exercitados foi observado aumento de BDNF em ambos os lados na porção ventral do mesencéfalo três dias após lesão (EX 6-OHDA 3d) (Fig. 25B).

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da (s) variável (is) descrita (s) encontram-se nos *anexos XVIII e XIV*, páginas 144 e 145.

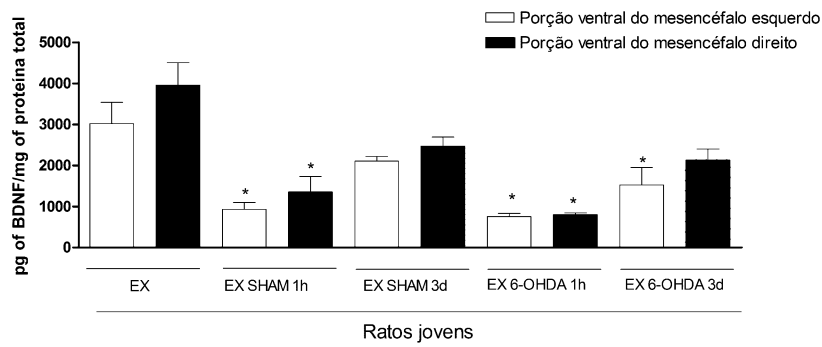
Figura 25: Efeito do exercício físico em esteira previamente a lesão por 6-OHDA sobre os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo (A e B) e *striatum* (C e D) de ratos jovens. Os níveis de BDNF foram expressos em pg BDNF/mg proteína total. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.* = $p < 0,05$ vs. mesmo lado do grupo SED (sedentários não submetido a qualquer procedimento cirúrgico) ou EX (exercitados não submetido a qualquer procedimento cirúrgico).

Figura 25:

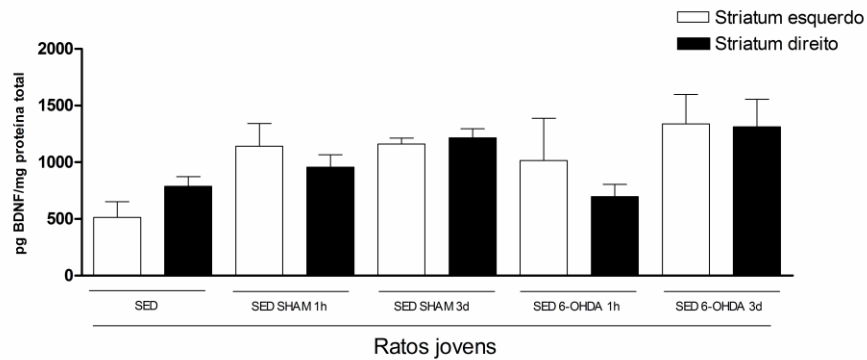
A



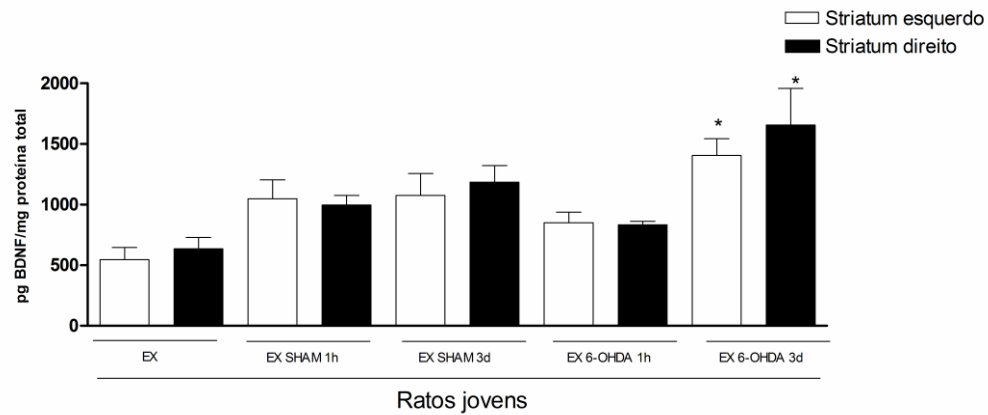
B



C



D



4.5.4 Efeito do exercício físico prévio em esteira sobre os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo de ratos adultos

Uma hora após a lesão por 6-OHDA, animais adultos sedentários (SED 6-OHDA 1h), apresentaram redução bilateral dos níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo. Ratos submetidos à administração do veículo da 6-OHDA uma hora (SED SHAM 1h) ou três dias (SED SHAM 3d) também apresentaram esta redução. Três dias após a lesão, ratos SED 6-OHDA 3d demonstraram retorno dos níveis desta neurotrofina aos valores controles (SED).

Este padrão de resultados foi observado também em animais exercitados (EX 6-OHDA 1h e EX 6-OHDA 3d), mas nestes, animais EX SHAM 1 h e EX SHAM 3d apresentaram valores iguais aos controles (EX).

Quando se comparou os animais SED e EX verificou-se que o exercício por si só reduziu os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo de ratos adultos.

No que se refere ao *striatum*, ratos adultos SED, SED SHAM 1h, SED SHAM 3d, SED 6-OHDA 1h e SED 6-OHDA 3d apresentaram valores similares de BDNF.

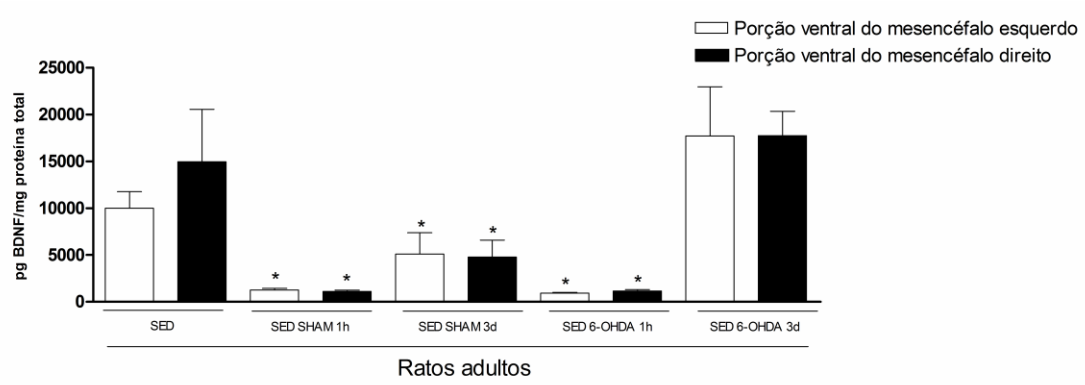
Em ratos exercitados, a lesão da SNpc direita gerou aumento bilateral do BDNF no *striatum*, tanto uma hora (EX 6-OHDA 1h) quanto três dias após a lesão (EX 6-OHDA 3d) (Fig. 26D). Animais EX SHAM 1h e EX SHAM 3d também apresentaram este aumento.

Os valores amostrais (n), médias e erros médios padrão (EMP) da (s) variável (is) descrita (s) encontram-se nos *anexos XX e XXI*, páginas 146 e 147.

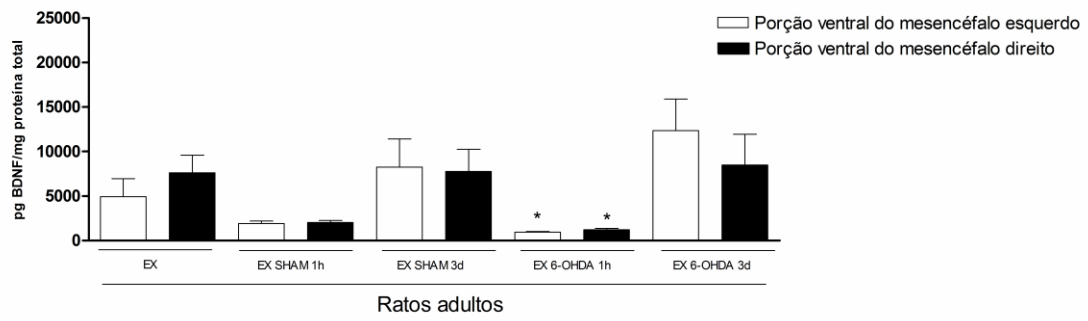
Figura 26: Efeito do exercício físico em esteira previamente a lesão por 6-OHDA sobre os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo (A e B) e *striatum* (C e D) de ratos adultos. Os níveis de GDNF foram expressos em pg GDNF/mg proteína total. Os valores representam as médias (\pm EMP). Análise estatística: Teste *t* de Student.* = $p < 0,05$ vs. mesmo lado do grupo SED (sedentários não submetidos a qualquer procedimento cirúrgico).

Figura 26:

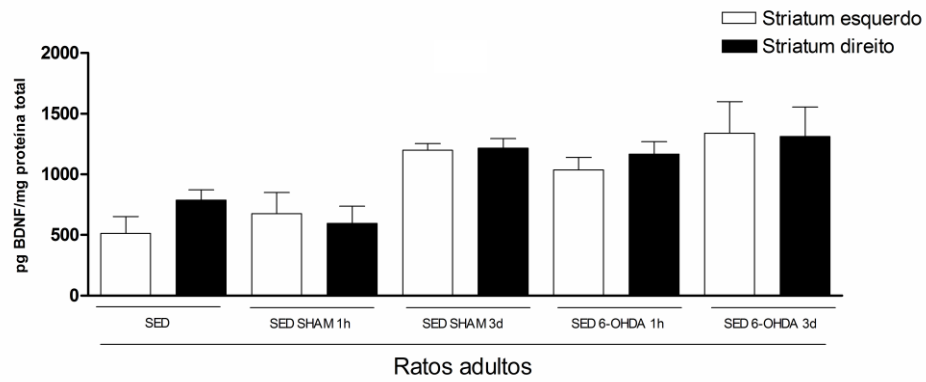
A



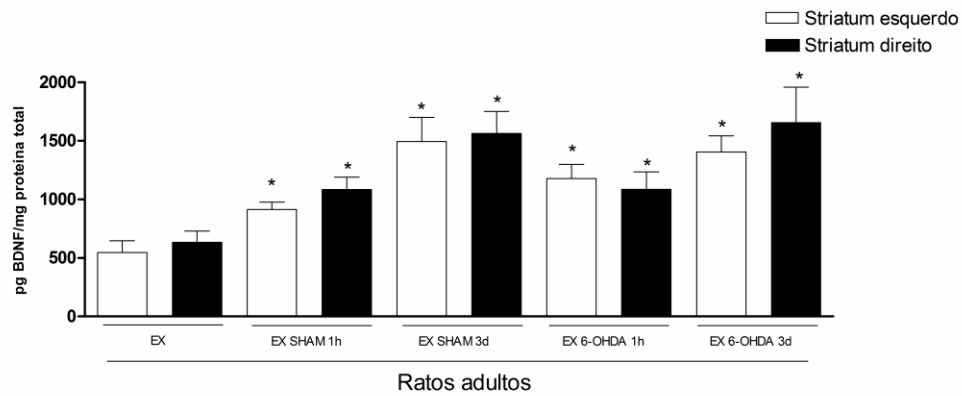
B



C



D



5. DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo investigar se a prática de exercício físico em esteira previamente à administração de 6-OHDA interfere na resposta inicial da substância negra do mesencéfalo e *striatum* frente à lesão. Para isso, ratos Wistar machos jovens foram submetidos a exercício físico de intensidade moderada, ajustada individualmente de acordo com a capacidade aeróbica de cada animal. O exercício foi realizado diariamente por três semanas, e em seguida procedeu-se a lesão da substância negra do mesencéfalo *pars compacta* direita por injeção de 6-OHDA. Três dias após a lesão, foi avaliado o desempenho motor nos seguintes testes comportamentais: teste da impressão da pata, teste na trave de equilíbrio e na grade vertical, assim como no campo aberto. Ainda, três dias após a lesão, foram analisados a taxa de sobrevivência de neurônios TH-positivos na SNpc e a densidade de astrócitos GFAP-positivos na porção ventral do mesencéfalo. Os níveis de GDNF e BDNF na porção ventral do mesencéfalo e no *striatum* de ratos jovens e também de ratos adultos foram analisados uma hora e três dias após a lesão por 6-OHDA. Nossos resultados revelaram que, no momento analisado, o exercício físico prévio impediu a instabilidade postural dinâmica durante a marcha, a lentidão durante movimento coordenado contra a gravidade, induziu a expressão inicial de GDNF e BDNF no *striatum*, mas não preveniu a morte dos neurônios dopaminérgicos na SNpc.

Estudos clínicos e em modelos animais, utilizando protocolos diversos para investigar a influência do exercício físico sobre a plasticidade do sistema nervoso central (Cotman e Berchtold, 2002; Vayman e Gomez-Pinilla, 2005) e sobre a neuroproteção contra desordens degenerativas (Goodwin *et al.*, 2008, Honea *et al.*, 2009) têm sido descritos em revisões da literatura. Grande parte dos trabalhos investiga o exercício físico em esteira posterior à lesão (Yoon *et al.*, 2007; Tajiri *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2011; Dutra *et al.*, 2012) e poucos abordam exercício físico prévio à lesão dopaminérgica (Zigmond *et al.*, 2009). Nesse aspecto, torna-se importante abordar o exercício físico prévio como procedimento capaz de alterar a plasticidade neural desencadeada por uma lesão e promover alterações do microambiente neuronal, resultando em modificações de características estruturais e funcionais.

A prescrição do exercício físico pode ser distinta entre estudos: enquanto alguns autores utilizam exercícios físicos voluntários na investigação de mecanismos neurobiológicos da neuroproteção (Mabandla *et al.*, 2004; Zigmond *et al.*, 2009; Fredriksson *et al.*, 2011), nosso estudo utilizou exercício moderado, forçado em esteira, prescrito de acordo com a capacidade aeróbica individual dos animais. O exercício físico em esteira permite o controle de parâmetros como frequência, intensidade e duração, enquanto a prática de exercício voluntário não (Pietrelli *et al.*, 2012).

Apesar de o exercício físico em esteira já ser utilizado em estudos em modelos animais de patologias neurodegenerativas (Tillerson *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2007; Hoveida *et al.*, 2011), destaca-se que poucos consideram o desempenho e capacidade aeróbica intrínseca e individual dos ratos submetidos ao exercício físico em esteira (Kim *et al.*, 2002; Lacerda *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2010; Burghardt *et al.*, 2011), relacionada com as diferentes aptidões em relação à corrida inerentes aos animais (Waters *et al.*, 2008; Grooves-Chapman *et al.*, 2011). A capacidade aeróbica e muscular para o exercício varia entre ratos (Henderson *et al.*, 2002) e também em humanos (Pringle *et al.*, 2003). Nosso estudo confirmou a diferença no desempenho físico aeróbico durante a avaliação em esteira entre ratos jovens e adultos, portanto, a avaliação prévia do desempenho físico é aconselhável para estabelecer valores de referência antes de se iniciar um programa de exercício, o que ajudará nas recomendações do exercício, não somente para ratos (Copp *et al.*, 2009), mas também para seres humanos (Meyer, 1999). A avaliação de desempenho individual torna-se importante principalmente entre animais jovens, considerando que os mesmos apresentaram desempenho variado, o que gerou a divisão em grupos e aplicação de velocidades diferentes para que todos corressem com a mesma intensidade, neste caso, moderada.

O exercício físico de intensidade moderada em esteira foi utilizado no presente estudo de acordo com orientações clínicas preconizadas para melhorar o funcionamento cerebral (Hillman *et al.*, 2008). Sabe-se que exercícios físicos intensos ou exaustivos prejudicam a função cognitiva em ratos (Rosa *et al.*, 2007) e aumentam o estresse oxidativo em humanos quando comparados ao exercício de intensidade moderada (Wang e Huang, 2005). A expressão de fatores neurotróficos como o BDNF no hipocampo de ratos

hígidos é dependente da velocidade na qual o animal é exercitado. Animais exercitados em intensidade baixa apresentam maiores níveis de BDNF quando comparados a animais exercitados em intensidade moderada ou alta (Lou *et al.*, 2008). Além disso, o exercício físico intenso promoveu disfunção mitocondrial devido à redução dos níveis de BDNF no córtex frontal (Aguiar *et al.*, 2008) e *striatum* (Aguiar *et al.*, 2010) de camundongos. O exercício físico moderado e agudo, minimamente estressante, é capaz de induzir a expressão de BDNF no hipocampo de ratos, indicando que o exercício físico moderado pode gerar benefícios ao funcionamento do sistema nervoso central quando comparado a maiores intensidades (Soya *et al.*, 2007).

Outro ponto diferencial deste trabalho relaciona-se ao período em que o exercício físico em esteira foi realizado. Diversos estudos expõem os animais ao exercício após a lesão (Tillerson *et al.*, 2003; Poulton e Muir; 2005; Yoon *et al.*, 2007), abordando os efeitos reabilitadores da prática aeróbica diária. Não há estudos relatando, entretanto, o papel do exercício físico em esteira, prévio à lesão, como forma de prevenção ou atenuação de sinais motores em modelo experimental na fase inicial da DP. Nesta direção, já foi descrito em seres humanos que a prática de exercício físico consiste em fator protetor contra a DP de início precoce (Tsai *et al.*, 2002).

A maior parte dos estudos aborda os déficits motores e alterações morfológicas presentes no modelo experimental da DP em análises tardias, aproximadamente duas semanas após a administração de 6-OHDA. É neste momento em que a maior parte dos prejuízos comportamentais motores está aparente e é quando o déficit dopaminérgico atinge 60 a 80% do conteúdo total no *striatum* (Lee *et al.*, 1996). O presente estudo abordou a reação inicial da SNpc e *striatum* frente ao exercício físico diário e lesão, investigando a expressão de fatores neurotróficos após o dano tecidual, como uma das respostas compensatórias no início da lesão causada pela 6-OHDA. Mecanismos compensatórios que envolvem expressão diferencial de fatores neurotróficos podem ocorrer durante o período pré-sintomático no modelo experimental da DP, sendo considerados, em parte, como um dos fatores envolvidos em adiar o aparecimento de sinais motores (Aliaga *et al.*, 2000; Bustos *et al.*, 2009). Desta forma, a compreensão destes mecanismos compensatórios, como a produção de fatores neurotróficos e resposta dos

astrócitos podem ser úteis para o desenvolvimento de intervenções preventivas e reabilitadoras das disfunções motoras observadas na DP.

A análise de marcha é um teste simples da estabilidade postural dinâmica que pode ser aplicado em estudos com animais (Metz *et al.*, 2005; Brooks e Dunnett, 2009). A expressão evidente dos déficits comportamentais de ratos submetidos à lesão dopaminérgica por 6-OHDA são vistos geralmente a partir de duas semanas após a lesão, entretanto, o prejuízo motor pode ser detectado em uma semana (Grealish *et al.*, 2008) ou quatro dias (Hsieh *et al.*, 2011) após a lesão. Neste estudo, a avaliação da marcha de ratos sedentários, realizada somente três dias após a lesão por 6-OHDA demonstrou aumento da largura do passo ou alargamento da base de suporte ao caminhar, indicando instabilidade postural dinâmica. Por outro lado, ratos previamente exercitados não demonstraram alargamento da base de suporte três dias após a lesão, sugerindo que estes animais encontram-se protegidos contra déficits iniciais na marcha causados pela lesão dopaminérgica por 6-OHDA. Nossos dados corroboram os resultados já descritos por outros autores. Chuang e colaboradores (2010) avaliaram a marcha de ratos adultos submetidos à injeção unilateral de 6-OHDA na via nigroestriatal e demonstraram que houve aumento da base de suporte de animais hemiparkinsonianos, além de redução da pressão de contato das patas e da velocidade da caminhada. Ainda, Fernagut e colaboradores (2002) indicaram que após a administração de MPTP em camundongos, houve redução do comprimento do passo e esta medida estaria diretamente relacionada à magnitude da perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra do mesencéfalo ou no *striatum*. Metz e colaboradores (2005) corroboram esses dados, ressaltando que a depleção unilateral dopaminérgica gera diminuição do comprimento do passo e que este padrão locomotor foi acompanhado da atividade prolongada nos músculos flexores do tornozelo ipsilaterais à lesão, assim como atividade prolongada nos músculos extensores do tornozelo contralaterais à lesão. O exercício físico realizado após a lesão é capaz de melhorar os déficits comportamentais motores induzidos por 6-OHDA em ratos (Tillerson *et al.*, 2003; Poulton e Muir, 2005).

Em humanos portadores da DP, o treinamento físico em esteira motorizada é capaz de melhorar a velocidade de caminhada, na instabilidade

postural e redução do medo de quedas, todos analisados por questionários específicos, como *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS), Escala de Equilíbrio de Berg, Índice dinâmico da marcha e *Falls Efficacy Scale* (FES) (Cakit *et al.*, 2007). Estes resultados foram corroborados por outros (Protas *et al.*, 2005; Herman *et al.*, 2007). Durante sessões de Fisioterapia, pacientes portadores da DP envolvem-se em atividades que utilizam pistas visuais, auditivas (Rochester *et al.*, 2005) e exercício físico em esteira motorizada, com intensidade ajustada para o desempenho do indivíduo, com ou sem suporte parcial de peso. Frazzitta e colaboradores (2009) relataram o exercício físico em esteira motorizada foi mais eficaz em minimizar déficits de marcha quando comparado ao tratamento sem o uso da esteira, por esta impor ritmo externo e focar a atenção na marcha.

O presente estudo demonstrou que três dias após a lesão por 6-OHDA não há déficits motores na marcha de ratos exercitados quando comparados a animais sedentários e esse resultado pode ser justificado pela hipótese de que o exercício físico prévio em esteira motorizada por três semanas pode imprimir determinado ritmo de marcha na memória procedural ou implícita dos ratos. Abbruzzese e colaboradores (2009) indicaram que o exercício físico aprimora a memória implícita de seres humanos portadores da DP. Em nosso estudo, durante o exercício físico em esteira os ratos frequentemente apresentaram passos de corrida na velocidade usada, e nesta situação, sabe-se que a base de suporte encontra-se reduzida, assim como o tempo gasto na fase de duplo apoio (Biewener, 2006). Com a exposição diária ao exercício físico em esteira motorizada, pode ser aceitável que os circuitos neurais dos núcleos da base, envolvidos na iniciação e movimentos automáticos, tenham apresentado maior ativação e reforço sináptico, refletido pela melhor estabilidade dinâmica durante a marcha dos ratos exercitados. Estudos de Grillner *et al.*, (2008) e Grillner, (2006) indicam que a repetição de movimentos durante a locomoção reforça a estrutura sináptica de neurônios dos núcleos da base.

Além da impressão da pata na análise de marcha, o presente estudo investigou o equilíbrio estático e dinâmico de ratos jovens na trave de equilíbrio, que consiste em uma análise comportamental que exige coordenação motora e equilíbrios estático e dinâmico (Kharatishvili *et al.*, 2009). Nossos resultados indicaram que, na fase inicial do modelo

experimental da DP, ou seja, três dias após a lesão por 6-OHDA, ratos sedentários e exercitados ainda não apresentam déficits motores que pudessem ser detectáveis através de teste na trave de equilíbrio. A latência sobre o aparato de teste não se modifica com a experiência (Allbutt *et al.*, 2007). Durante o período de aprendizagem, ratos controle (não lesados por 6-OHDA) não apresentaram diferença na latência ou tempo total de permanência sobre a trave de equilíbrio. Nossos resultados corroboram estes dados, indicando que ratos sedentários hígidos não demonstraram modificação do comportamento motor durante os três dias de aprendizagem. Observando os ratos exercitados, entretanto, nosso estudo indicou que no primeiro dia eles exibiram comportamento exploratório mais frequente, e conseqüentemente, um maior número de ratos desceu ou caiu do aparato de teste. Já no segundo dia, eles foram capazes de aprender a ficar no aparato por mais tempo, e este comportamento permaneceu mesmo após a lesão da SNpc direita por 6-OHDA.

Recentemente, Kim e colaboradores (2010) desenvolveram um novo teste de coordenação motora e equilíbrio dinâmico contra a ação da gravidade. Neste teste, o animal é colocado em uma grade vertical e deve sair da posição inicial com o focinho direcionado para cima, para posição de descida. Além disso, os animais devem descer do aparato, em um menor tempo possível, sem quedas ou deslizamentos. O teste avalia parâmetros como tempo para girar, tempo para descer e tempo total gasto no aparato de teste, que nada mais é do que a soma dos outros dois parâmetros. Estes autores avaliaram o desempenho de camundongos hígidos e submetidos ao modelo experimental da DP. Os resultados indicaram que animais parkinsonianos despendem mais tempo para girar e durante todo o teste, como era esperado. Nossos dados corroboram estes resultados, indicando que animais sedentários hemiparkinsonianos gastaram mais tempo para concluir o teste quando comparados ao comportamento prévio à lesão. Além disso, o presente estudo apresentou, de maneira inédita, que animais previamente exercitados mantiveram a mesma performance nos parâmetros analisados pré e pós lesão, indicando que o exercício prévio foi capaz de impedir a dificuldade motora em realizar o teste.

Em relação ao teste no campo aberto, nossos resultados indicaram que não houve diferença significativa nos parâmetros de número de quadrantes visitados, número de *rearing*, e tempo gasto em *grooming* entre ratos sedentários e exercitados, indicando que o exercício físico prévio à lesão não foi capaz de modificar o comportamento motor exploratório e a locomoção espontânea, assim como a lesão por 6-OHDA, no período analisado. Ressalta-se que após a desnevação da via dopaminérgica nigral sobre os neurônios estriatais, pode ser necessária a administração de agonistas dopaminérgicos como a apomorfina para que os animais exibam aumento na atividade locomotora (Schwartz e Carey, 1998) e diferença no número de quadrantes visitados em determinado período de tempo.

O comportamento de *grooming* é um comportamento inato que envolve cuidado próprio presente em diversas espécies (Fentress, 1977; Spruijt *et al.*, 1992), sendo uma parte importante do comportamento em roedores (Berridge and Whishaw, 1992). Este ritual complexo geralmente ocorre na direção cefalo-caudal e abrange vários estágios como lambar as patas, movimentos de lavar a cabeça, lambar os pêlos, rabo e limpeza da região genital (Berridge and Aldridge, 2000 a, b). Estudos experimentais em roedores indicam que o *grooming* participa na adaptação ao estresse, caracterizando uma forma como estes animais lidam com agentes estressores (Kametani, 1988; Schulz-Klaus, 2009). Ratos jovens submetidos à lesão da SNpc por 6-OHDA não apresentaram diferença no comportamento de *grooming* desde o primeiro ao sétimo dia após a lesão (Fornaguera e Schwartz, 1999) e também nos comportamentos de *grooming* e *rearing* e de atividade locomotora espontânea, observados de um dia a 30 dias após o tratamento com 6-OHDA (Fornaguera e Schwartz, 2002). Ainda, Alam e colaboradores (2004) indicaram que três semanas após a administração de rotenona, não houve diferença no número de *rearing* em ratos adultos.

A análise da densidade de neurônios dopaminérgicos em um período inicial após a injeção de 6-OHDA em dose única, na substância negra, levou à significativa morte neuronal nessa região cerebral. Ainda, a morte neuronal ocorreu independentemente da prática de exercício prévio, pelo menos nos parâmetros utilizados em nosso experimento. Apesar da prática diária de exercício físico moderado em esteira, adaptado para a capacidade aeróbica

individual, durante três semanas, a taxa de morte neuronal foi similar nos animais exercitados e sedentários expostos a 6-OHDA.

No presente estudo, o exercício físico não foi capaz de impedir a morte neuronal. Em relação à neuroproteção, os dados da literatura são controversos. Nossos dados corroboram alguns resultados anteriores, mas não outros. Howells e colaboradores (2005) verificaram que, em ratos adultos exercitados voluntariamente em rodas por uma semana antes da lesão do feixe prosencefálico medial por 6-OHDA, não há preservação do número de neurônios TH-positivos na SNpc. Segundo O'Dell e colaboradores (2007) há morte de neurônios TH-positivos após a administração unilateral de 6-OHDA na via nigroestriatal em ratos exercitados em rodas e esta redução do número de neurônios TH-imunoreativos na SNpc 25 dias após a injeção é similar à observada em ratos sedentários 25 dias após a lesão por 6-OHDA. Yoon e colaboradores (2007), por sua vez, utilizaram a esteira para o exercício físico de ratos com intensidade leve, mas não ajustada ao desempenho individual. O exercício, porém, foi feito durante 14 dias após a administração de 6-OHDA no *striatum*. Estes autores indicaram que houve preservação de neurônios TH-positivos na SNpc de ratos exercitados quando comparados aos sedentários. Já Mabandla e colaboradores (2004), indicaram que a exposição ao exercício voluntário em roda por 14 dias previamente ao mesmo tipo de lesão foi capaz de prevenir a perda dopaminérgica e também o déficit na utilização da pata dianteira, desencadeada pela lesão dopaminérgica unilateral. Ainda, outros estudos relataram que o uso forçado de membros, seja por meio da terapia de contenção ou restrição do membro não afetado ou em esteira motorizada levaram à aparente proteção de fibras neuronais dopaminérgicas, assim como melhoraram déficits motores (Tillerson *et al.*, 2002; Cohen *et al.*, 2003). Tillerson e colaboradores (2002) relataram que o uso forçado do membro afetado devido à imobilização do membro não afetado na primeira semana após a injeção de 6-OHDA, preveniu o uso preferencial do membro não acometido durante explorações verticais e reduziu o número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina.

A partir da análise de estudos prévios, observa-se que a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos após lesão com 6-OHDA mostra-se bastante variada, em função de diversos fatores, incluindo o local de injeção da droga, o

período de análise da sobrevivência neuronal após lesão, além do tipo, período e extensão do exercício aplicado. A diferença entre resultados já descritos e o nosso pode ser devida ao local de aplicação da 6-OHDA, uma vez que a administração desta neurotoxina diretamente sobre os corpos neuronais dopaminérgicos causou, em nosso estudo, três dias após a lesão, intensa redução da densidade de neurônios TH-positivos. A administração da 6-OHDA no *striatum* pode permitir depleção parcial dos neurônios dopaminérgicos e assim, a possibilidade de maior sobrevivência neuronal na SNpc.

Nosso estudo não observou alteração no número de astrócitos na porção ventral do mesencéfalo de ratos três dias após lesão dopaminérgica, independentemente dos animais serem sedentários ou exercitados. Uma análise de um maior número de animais, ou em momento posterior e até mesmo no *striatum* é importante para esclarecermos este resultado.

De maneira interessante, Anastasia e colaboradores (2009) demonstraram que a exposição contínua a ambiente enriquecido prévia e posteriormente à injeção de 6-OHDA aumentou a densidade de astrócitos GFAP-positivos no *striatum* e reduziu o prejuízo motor observado em ratos alojados em ambiente padrão. O período analisado por estes autores foi de quatro dias após a administração da droga no feixe prosencefálico medial. O local de administração da 6-OHDA parece ser importante para a resposta dos astrócitos locais frente à lesão. É reconhecido que os astrócitos se tornem reativos após injúria do sistema nervoso central (McGeer e McGeer, 2008). A resposta astrocítica é detectada apenas tardiamente, três semanas após a injeção estriatal de 6-OHDA e, tipicamente, a reação destas células da glia consiste em hipertrofia dos processos celulares e supra-regulação da GFAP (Gomide *et al.*, 2005). Os astrócitos reativos provavelmente participam de processos endógenos reparadores ou protetores dos neurônios TH-positivos nigrais, desencadeados após a exposição a 6-OHDA intraestriatal, possivelmente envolvendo a produção de GDNF na substância negra (Ericson *et al.*, 2005).

Vale salientar que em ratos exercitados, três dias após a lesão houve maior expressão de GDNF e BDNF no *striatum*. Neste momento após a lesão, ratos exercitados apresentaram melhor desempenho nos testes comportamentais como o da impressão da pata, na grade vertical quando

comparados a animais sedentários, portanto os mecanismos subjacentes a melhora resposta motora podem refletir a atuação de mecanismos endógenos baseados no aumento da produção de fatores neurotróficos como GDNF e BDNF na SNpc e sua eferência, o *striatum*. A expressão diferencial de GDNF e BDNF em ratos exercitados pode constituir o mecanismo compensatório inicial possivelmente responsável pela melhor resposta motora nos testes analisados.

Existem poucos trabalhos que relatam a prática de exercício físico previamente à lesão dopaminérgica que mimetiza a DP. Um deles foi realizado por Cohen e colaboradores (2003), que relataram prejuízos comportamentais motores e neuroquímicos gerados pela 6-OHDA, e estes foram minimizados pela terapia do uso forçado previamente à lesão. Estes autores ainda indicaram que após esta terapia, houve aumento dos níveis de GDNF no *striatum*, correspondendo à maior utilização do membro.

A existência de mecanismos compensatórios após lesão parcial da via nigroestriatal aponta para modificações neuroquímicas geradas no *striatum* para manutenção da homeostase dopaminérgica que, de forma não linear, correlaciona-se a déficits comportamentais. Os mecanismos compensatórios podem envolver fatores como propriedades intrínsecas dos neurônios dopaminérgicos envolvidos diretamente na plasticidade neural (Bezard *et al.*, 2003).

A associação entre exercício físico e produção de fatores neurotróficos é bem demonstrada tanto em humanos como em modelos experimentais. Fatores neurotróficos são considerados os melhores candidatos na mediação entre os exercícios físicos e os seus efeitos sobre a plasticidade neural (Cotman e Berchtold, 2002; Vaynman *et al.*, 2006). O aumento dos níveis de BDNF no hipocampo de ratos hípidos foi observado em animais exercitados por cinco dias em rodas de corrida voluntária quando comparados aos sedentários (Cotman e Berchtold, 2002). Nesta mesma direção, existe uma supra-regulação de BDNF no hipocampo, córtex cerebral e cerebelo, mesmo com poucos dias de prática de exercício físico, desde dois a sete dias de corrida voluntária em rodas (Neeper *et al.*, 1996). Ploughman e colaboradores (2007) indicaram que imediatamente após o exercício forçado em esteira em intensidade moderada, os níveis de BDNF no hipocampo de ratos exercitados se encontraram elevados quando comparados a ratos sedentários.

Recentemente, Tajiri et al. (2010) demonstraram que ratos exercitados em esteira após a lesão por 6-OHDA apresentaram aumento dos níveis de BDNF e também GDNF bilateralmente no *striatum* quando comparados a animais sedentários. Nesse estudo, os efeitos reabilitadores do exercício físico em esteira no modelo experimental da DP foram também observados no comportamento motor, no teste do cilindro e no teste de rotação induzida por apomorfina.

Fatores neurotróficos como o GDNF e o BDNF são amplamente reconhecidos como os mecanismos endógenos pelos quais o exercício físico atua sobre a neuroproteção do sistema nervoso central (Cotman e Berchtold, 2002; Hennigan *et al.*, 2007). A expressão de ambos os fatores, GDNF e BDNF, encontra-se significativamente reduzida em pacientes portadores da DP, inferindo-se que a neurodegeneração observada na DP é parcialmente devida à plasticidade neural negativa, associada à redução do conteúdo de fatores neurotróficos (Howells *et al.*, 2000; Chauhan *et al.*, 2001). Em modelos experimentais, a recuperação neuronal após a administração de 6-OHDA é aparentemente relacionada ao aumento dos níveis estriatais de GDNF e BDNF (Cohen *et al.*, 2003; Tajiri *et al.*, 2010).

Nossos resultados demonstraram a reação encefálica frente ao insulto neurotóxico pode ser observada tão cedo quanto uma hora ou três dias após a lesão, e apresentou-se diferente em ratos sedentários e exercitados e também em ratos jovens e adultos. Apesar de o impacto do exercício físico sobre os fatores neurotróficos ser bem documentada na literatura científica, estudos sobre o efeito do exercício físico diário em esteira com intensidade moderada, ajustada de acordo com a capacidade aeróbica individual, realizado previamente à lesão da SNpc por 6-OHDA não foram aventados. Após lesão aguda da SNpc, como demonstrado no presente estudo, os níveis endógenos de GDNF e BDNF na porção ventral do mesencéfalo e *striatum* de ratos sedentários ou exercitados, jovens e adultos foram analisados.

Três semanas de exercício físico em esteira *per se* não aumentaram os níveis de GDNF e de BDNF na porção ventral do mesencéfalo e *striatum* de ratos jovens e nem de ratos adultos.

Após a lesão com 6-OHDA, ratos sedentários de ambas as faixas etárias apresentam redução dos níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo

tanto uma hora como três dias após a lesão. Em contrapartida, animais tanto jovens como adultos, submetidos à lesão, mas previamente exercitados, apresentam níveis de GDNF similares aos animais apenas exercitados, tanto uma hora como três dias após lesão. Ou seja, o exercício parece minimizar o efeito da 6-OHDA sobre a produção de GDNF e BDNF, na porção ventral do mesencéfalo e *striatum*. Os benefícios causados pelo exercício físico por meio do GDNF devem envolver a interação deste fator neurotrófico com o seu receptor, iniciando então, a ativação intracelular da ERK que produz alterações citoplasmáticas nos neurônios dopaminérgicos (Smith e Zigmond, 2003). É possível que a sinalização intracelular por meio da ligação do GDNF ao seu receptor seja ativada após os níveis proteicos de GDNF terem retornado aos valores basais.

No *striatum*, a idade jovem parece favorecer a resposta frente à lesão, considerando os níveis de GDNF: ratos jovens sedentários lesados apresentam níveis mais elevados de GDNF bilateralmente uma hora após a lesão quando comparados a animais jovens sedentários não lesados, a ratos jovens sedentários lesados e analisados após três dias e também quando comparados a animais adultos. Animais jovens previamente exercitados, quando lesados, apresentam elevação bilateral dos níveis de GDNF, enquanto adultos, somente no lado oposto à lesão.

Yurek e Fletcher-Turner (2001), descreveram que ratos jovens hígidos apresentam níveis mais elevados de GDNF na porção ventral do mesencéfalo e *striatum* quando comparados a ratos idosos também hígidos. Além disso, estes autores demonstraram que duas semanas após a administração de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial, ratos jovens apresentaram níveis mais elevados de GDNF tanto na porção ventral do mesencéfalo quanto *striatum* quando comparados a animais idosos hemiparkinsonianos. Fox e colaboradores (2001) relataram que o GDNF pode proteger os neurônios dopaminérgicos contra os efeitos deletérios da 6-OHDA de ratos jovens e idosos, entretanto, a proteção é menor nestes últimos.

Faherty e colaboradores (2005) demonstraram que a exposição ao ambiente enriquecido, numa combinação entre exercício físico e interação social, previamente à lesão, foi capaz de proteger neurônios dopaminérgicos de camundongos adultos no modelo da DP utilizando MPTP. Segundo estes

mesmos autores a neuroproteção dopaminérgica foi mediada pelo aumento nos níveis de GDNF e também nos níveis de BDNF na substância negra do mesencéfalo de animais alojados em ambiente enriquecido previamente à lesão. O presente estudo corrobora estes dados, demonstrando que em ratos jovens exercitados os níveis de GDNF no *striatum* encontravam-se aumentados quando comparados a animais não lesados uma hora ou três dias após a lesão. Interessantemente, os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo de animais jovens e adultos exercitados e lesados, uma hora ou três dias após a lesão, não apresentaram a diminuição observada em animais jovens e adultos sedentários lesados. No *striatum*, os animais jovens e adultos exercitados e lesados apresentaram aumento dos níveis de GDNF uma hora e também três dias após a lesão. Sugerimos que maiores níveis de GDNF no *striatum* de animais jovens e adultos exercitados e lesados poderia influenciar, via transporte retrógrado, os níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo destes ratos, uma vez que não se observou a queda destes níveis uma hora ou três dias após a lesão em ratos jovens e adultos exercitados.

O GDNF constitui importante fator de proteção neuronal contra a 6-OHDA em modelo experimental da DP, quando administrado previamente a 6-OHDA. O GDNF pode ser transportado por via retrógrada para a SNpc, uma vez que o *striatum* é uma eferência dos neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc (Tomac *et al.*, 1995; Giehl *et al.*, 1998) ou em via anterógrada e retrógrada bilateral (Siegel e Chauhan, 2001), o que poderia ter minimizado eventual diminuição dos fatores neurotróficos desencadeada pela lesão e mantendo os níveis como os apenas exercitados, sem diminuir como ocorreu nos sedentários. O aumento dos níveis de GDNF no *striatum* poderia contribuir para posterior recuperação dos neurônios dopaminérgicos na SNpc, uma vez que o GDNF quando administrado no *striatum* de ratos estimula o brotamento axonal colateral de neurônios da SNpc e a reinervação dos neurônios estriatais de acordo com Rosenblad, 1998. A proteção de neurônios dopaminérgicos da SNpc foi observada quando o GDNF foi administrado na SNpc seis horas, e não uma, antes da neurotoxina (Kearns *et al.*, 1997) e este efeito protetor parece não depender da idade do animal (Fox *et al.*, 2001). Safi e colaboradores (2011) verificaram *in vitro* que níveis aumentados de GDNF são críticos para a proteção dos neurônios dopaminérgicos contra a morte celular

gerada pelo modelo experimental da DP. Estes autores utilizaram astrócitos para produzir maiores quantidades de GDNF, mas observaram, entretanto, que altos níveis de GDNF não promoveram sobrevivência celular adicional após exposição a 6-OHDA. O mecanismo neuroprotetor exercido pelo GDNF não é totalmente esclarecido, mas pode envolver o aumento da atividade da ERK, PI3K e MAPK em diferentes tipos celulares (Ugarte *et al.*, 2003).

Nosso estudo indicou que as alterações nos níveis de GDNF na porção ventral do mesencéfalo de ratos jovens ocorreram em ambos os hemisférios cerebrais. Já no *striatum* de ratos adultos exercitados, as alterações foram contralaterais à lesão. Alterações bilaterais dos níveis dopaminérgicos (Pierucci *et al.*, 2009), na atividade neuronal (Breit *et al.*, 2009) e no transporte axonal, restrito aos três dias após a lesão por 6-OHDA (Soria *et al.* 2011).

Além do GDNF, os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo e *striatum* de animais jovens e adultos, submetidos ou não ao exercício físico previamente à lesão por 6-OHDA apresentaram alterações que podem contribuir para esclarecer os mecanismos envolvidos na modulação da resposta encefálica à lesão por 6-OHDA. Uma hora após a lesão por 6-OHDA, ratos jovens e adultos sedentários e ratos jovens e adultos exercitados apresentaram redução dos níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo, bilateralmente. Sinais de lesão como redução bilateral dos níveis de BDNF podem estar relacionados ao processo edematoso gerado pela morte dos neurônios dopaminérgicos e podem acontecer devido a conexões interhemisféricas no encéfalo de ratos (Soria *et al.*, 2011). Três dias após a lesão por 6-OHDA, nos animais jovens sedentários e exercitados os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo direito retornaram aos valores pré-lesão. Quando analisamos os níveis de BDNF na porção ventral do mesencéfalo de animais jovens e adultos sedentários e exercitados, três dias após a lesão, estes apresentaram os mesmos valores em comparação aos níveis pré-lesão.

Ratos jovens sedentários apresentaram aumento dos níveis de BDNF somente no lado direito do *striatum* três dias após a lesão e não com uma hora, quando estes níveis ainda permaneceram similares a animais não lesados. Ratos adultos sedentários não apresentaram modificação dos níveis de BDNF à condição experimental de lesão, seja uma hora ou três dias após a lesão.

Ratos jovens exercitados apresentaram aumento dos níveis de BDNF no *striatum* bilateramente três dias após a lesão e não com uma hora, enquanto animais adultos exercitados apresentaram níveis mais elevados de BDNF no *striatum* uma hora e três dias após a lesão.

O exercício físico em esteira é capaz de induzir maior produção de fatores neurotróficos como o BDNF no *striatum* de ratos (Chang *et al.*, 2009) e GDNF (Tajiri *et al.*, 2010), além de induzir maior expressão de GFAP em astrócitos no *striatum* de ratos submetidos à lesão por 6-OHDA (Dutra *et al.*, 2012). O exercício físico é capaz de promover a ativação de vias intracelulares do BDNF e este é o provável mecanismo pelo qual se dá a neuroproteção (Molteni *et al.*, 2002). A prática de exercício físico em esteira por três semanas, previamente à oclusão da artéria cerebral média é capaz de proteger o córtex cerebral de ratos adultos contra o evento isquêmico (Liebelt *et al.*, 2010), reduzindo a apoptose neuronal e este efeito é mediado pela ativação da via de sinalização ERK 1 e 2 (Chaudhry *et al.*, 2010). Entre as vias de sinalização encontram-se a via PI3K-Akt, com importante papel na sobrevivência celular (Wumann e Pirola, 1998). A ligação entre o BDNF e o seu receptor TrkB ativa a via de sinalização intracelular PI3K-Akt e por meio desta via, o exercício físico afeta células nervosas e aumenta sua capacidade de defesa contra estímulos deletérios. Ainda, os efeitos benéficos do exercício físico não incluem alterações na resposta inflamatória, e sim ativação das vias de sinalização do BDNF, tornando-se assim, uma estratégia preventiva e de baixo custo contra a DP (Wu *et al.*, 2011). O BDNF, quando injetado no *striatum* é transportado de maneira retrógrada até a SNpc (Mufson *et al.*, 1994), onde fornece proteção aos neurônios dopaminérgicos submetidos à neurotoxina 6-OHDA (Stahl *et al.*, 2011).

5.1 Perspectivas geradas a partir deste trabalho

a) Considerando que o exercício físico possa contribuir para mecanismos neuroprotetores na DP, a utilização de modelo experimental com protocolo de exercício físico moderado prévio à lesão por 6-OHDA possibilita a investigação de aspectos adicionais da lesão, em ratos jovens e adultos e, ainda, em outros períodos após lesão: Entre

eles, citamos: Parâmetros adicionais de comportamento sensório-motor. Na trave de equilíbrio, poderão ser analisados, o número de giros e escorregões, postura preferencial do rabo e utilização deste como auxílio na base de suporte. No teste do campo aberto poderá ser verificado o comportamento rotatório espontâneo e o uso preferencial da pata dianteira não acometida, além de avaliação detalhada do padrão adotado durante o *grooming*.

b) Taxa de desnervação das fibras dopaminérgicas no *striatum*. Densidade de células da glia, não somente de astrócitos, mas também de microglíocitos, em diferentes regiões encefálicas, como *striatum*, córtex motor e cerebelo, além da substância negra.

c) Níveis de BDNF e GDNF no soro e outras regiões encefálicas, como córtex motor primário, hipocampo e cerebelo.

d) Participação de células da glia e neurônios na produção de GDNF e BDNF, através de ensaios imunocitoquímicos.

e) Níveis de citocinas inflamatórias (entre elas IL-10, IL-6, TNF- α) no soro em outras regiões encefálicas, como córtex motor primário, hipocampo e cerebelo.

6.CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no estudo com ratos Wistar submetidos a três semanas de exercício físico de intensidade moderada e diário em esteira previamente à lesão da substância negra do mesencéfalo por 6-hidroxidopamina, podemos concluir que:

1. O exercício físico prévio à lesão de intensidade moderada, por três semanas, apesar de não prevenir a morte neurônios dopaminérgicos submetidos à administração intranigral unilateral de 6-OHDA, possibilita minimizar os prejuízos motores iniciais observados na DP experimental;
2. O efeito positivo do exercício físico moderado sobre o comportamento motor pode ser, em parte, devido ao aumento da expressão de GDNF e BDNF na porção ventral do mesencéfalo e no striatum, o que contribuiria para um microambiente mais resistente à lesão.
3. O aumento dos níveis de GDNF e BDNF no período inicial pós-lesão não parecem ser devidas ao aumento do número de astrócitos na SNpr, mas possivelmente em outras áreas, como o *striatum*.
4. A resposta à lesão em jovens e adultos submetidos a exercício prévio pode ser diferente, uma vez que a expressão de GDNF e BDNF difere nas duas idades estudadas.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahlskog JE. Cheaper, simpler, and better: tips for treating seniors with Parkinson disease. **Mayo Clin Proc.** 86 (12):1211-1216. 2011.
- Airaksinen, M.S., A. Titievsky, and M. Saarma. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? **Mol Cell Neurosci.** 13: 313-25. 1999.
- Alam M, Mayerhofer A, Schmidt WJ. The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. **Behav Brain Res.** 151(1-2):117-24. 2004.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends Neurosci.** 12(10):366-75. 1989.
- Aliaga, E., C. Carcamo, J. Abarca, L. Tapia-Arancibia, and G. Bustos. Transient increase of brain derived neurotrophic factor mRNA expression in substantia nigra reticulata after partial lesion of the nigrostriatal dopaminergic pathway. **Brain Res Mol Brain Res.** 79:150-5. 2000.
- Allbutt HN, Henderson JM. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **J Neurosci Methods.** 159(2):195-202. 2007.
- Anastasia A, Torre L, de Erausquin GA, Mascó DH. Enriched environment protects the nigrostriatal dopaminergic system and induces astroglial reaction in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. **J Neurochem.** 109 (3):755-65. 2009.
- Ang, E.T., P.T. Wong, S. Moochhala, and Y.K. Ng. Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? **Neuroscience.** 118:335-45. 2003.
- Aoi, M., I. Date, S. Tomita, and T. Ohmoto. GDNF induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system in the rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. **Acta Neurochir (Wien).** 142:805-10. 2000.
- Aponso PM, Faull RL, Connor B. Increased progenitor cell proliferation and astrogenesis in the partial progressive 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neuroscience.** 151(4):1142-53. 2008.
- Archer T, Fredriksson A. Physical exercise attenuates MPTP-induced deficits in mice. **Neurotox Res.** 18(3-4):313-27. 2010.
- Aron L, Klein R. Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. **Trends Neurosci.** 34(2):88-100. 2011.
- Bach JP, Riedel O, Klotsche J, Spottke A, Dodel R, Wittchen HU. Impact of complications and comorbidities on treatment costs and health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. **J Neurol Sci.** 29. 2011.
- Balthazar CH, Leite LH, Rodrigues AG, Coimbra CC. Performance-enhancing and thermoregulatory effects of intracerebroventricular dopamine in running rats. **Pharmacol Biochem Behav.** 93(4):465-9. 2009.
- Barbosa MT, Caramelli P, Maia DP, Cunningham MC, Guerra HL, Lima-Costa MF, et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). **Mov Disord.** 21(6):800-8. 2006.
- Bennett, A.D., G. Tagliatela, R. Perez-Polo, and C.E. Hulsebosch. NGF levels decrease in the spinal cord and dorsal root ganglion after spinal hemisection. **Neuroreport.** 10:889-93. 1999.

- Berchtold, N.C., G. Chinn, M. Chou, J.P. Kesslak, and C.W. Cotman. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. **Neuroscience**. 133:853-61. 2005.
- Berridge KC, Aldridge JW. Super-stereotypy I: enhancement of a complex movement sequence by systemic dopamine D1 agonists. **Synapse**. 37(3):194-204. 2000a.
- Berridge KC, Aldridge JW. Super-stereotypy II: enhancement of a complex movement sequence by intraventricular dopamine D1 agonists. **Synapse**. 37(3):205-15. 2000b.
- Berridge KC, Whishaw IQ. Cortex, striatum and cerebellum: control of serial order in a grooming sequence. **Exp Brain Res**. 90(2):275-90. 1992.
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays**. 24(4):308-18. 2002.
- Bezard, E., S. Dovero, D. Belin, S. Duconger, V. Jackson-Lewis, S. Przedborski, P.V. Piazza, C.E. Gross, and M. Jaber. Enriched environment confers resistance to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and cocaine: involvement of dopamine transporter and trophic factors. **J Neurosci**. 23:10999-1007. 2003.
- Biernaskie J, Chernenko G, Corbett D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. **J Neurosci**. 24(5):1245-54. 2004.
- Bjorklund, A., C. Rosenblad, C. Winkler, and D. Kirik. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**. 4:186-200. 1997.
- Blandini, F., G. Nappi, C. Tassorelli, and E. Martignoni. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**. 62:63-88. 2000.
- Blum, D., S. Torch, N. Lambeng, M. Nissou, A.L. Benabid, R. Sadoul, and J.M. Verna. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**. 65:135-72. 2001.
- Bowling, A.C., and M.F. Beal. Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Life Sci**. 56:1151-71. 1995.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 72:248-54. 1976.
- Brooks, G.A., and T.P. White. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. **J Appl Physiol**. 45:1009-15. 1978.
- Burghardt PR, Flagel SB, Burghardt KJ, Britton SL, Gerard-Koch L, Watson SJ, Akil H. Risk-assessment and coping strategies segregate with divergent intrinsic aerobic capacity in rats. **Neuropsychopharmacology**. 36(2):390-401. 2011.
- Cakit BD, Saracoglu M, Genc H, Erdem HR, Inan L. The effects of incremental speed-dependent treadmill training on postural instability and fear of falling in Parkinson's disease. **Clin Rehabil**. 21(8):698-705. 2007.
- Caleo M., Tropea, D., Rossi, C., Gianfranceschi, L., Maffei, L. Environmental enrichment promotes fiber sprouting after deafferentation of the superior colliculus in the adult rat brain. **Experimental Neurology**. 216: 515–519. 2009.

Carro E., Trejo, J.L. e I. Torres-Aleman. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. **J Neurosci.** 21:1628-34. 2001.

Cass, W.A., and M.W. Manning. GDNF protection against 6-OHDA-induced reductions in potassium-evoked overflow of striatal dopamine. **J Neurosci.** 19:1416-23. 1999.

Cass, W.A., M.E. Harned, and S.L. Bailey. Enhanced effects of 6-hydroxydopamine on evoked overflow of striatal dopamine in aged rats. **Brain Res.** 938:29-37. 2002.

Chadchankar H, Ihalainen J, Tanila H, Yavich L. Decreased reuptake of dopamine in the dorsal striatum in the absence of α -synuclein. **Brain Res.** 1382:37-44. 2011.

Chang JW, Wachtel SR, Young D, Kang UJ. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. **Neuroscience.** 88(2):617-28. 1999.

Chen JJ. Parkinson's disease: health-related quality of life, economic cost, and implications of early treatment. **Am J Manag Care.** 16 Suppl Implications:S87-93. 2010.

Chuang CS, Su HL, Cheng FC, Hsu SH, Chuang CF, Liu CS. Quantitative evaluation of motor function before and after engraftment of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. **J Biomed Sci.** 13;17:9. 2010.

Ciucci MR, Ma ST, Kane JR, Ahrens AM, Schallert T. Limb use and complex ultrasonic vocalization in a rat model of Parkinson's disease: deficit-targeted training. **Parkinsonism Relat Disord.** Suppl 2:S172-5. 2008.

Cohen AD, Tillerson JL, Smith AD, Schallert T, Zigmond MJ. Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. **J Neurochem.** 85(2):299-305. 2003.

Connor, B., and M. Dragunow. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. **Brain Res Brain Res Rev.** 27:1-39. 1998.

Contin M, Martinelli P. Pharmacokinetics of levodopa. **J Neurol.** 257(Suppl 2):S253-61. 2010.

Copp, S.W., Davis, R.T., Poole, D.C., Musch, T.I.. Reproducibility of endurance capacity and VO₂peak in male Sprague-Dawley rats. **J. Appl. Physiol.** 106, (4), 1072-8. 2009.

Coskun P, Wyrembak J, Schriener S, Chen HW, Marciniack C, Laferla F, Wallace DC. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. **Biochim Biophys Acta.** 2011.

Cotman, C.W., and N.C. Berchtold. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci.** 25:295-301. 2002.

D'Amelio M, Ragonese P, Morgante L, Reggio A, Callari G, Salemi G, Savettieri G. Long-term survival of Parkinson's disease: a population-based study. **J Neurol.** 253(1):33-7. 2006.

de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol.** 5(6):525-35. 2006.

Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp Neurol.** 175(2):303-17. 2002.

Dunning CJ, Reyes JF, Steiner JA, Brundin P. Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? **Prog Neurobiol.** 2011.

Ebadi, M., S.K. Srinivasan, and M.D. Baxi. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.** 48:1-19. 1996.

Ericson C, Georgievska B, Lundberg C. Ex vivo gene delivery of GDNF using primary astrocytes transduced with a lentiviral vector provides neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci.** 22 (11): 2755-64. 2005.

Eslamboli A, Georgievska B, Ridley RM, Baker HF, Muzyczka N, Burger C, Mandel RJ, Annett L, Kirik D. Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. **J Neurosci.** 25(4):769-77. 2005.

Faherty CJ, Raviie Shepherd K, Herasimtschuk A, Smeyne RJ. Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. **Brain Res Mol Brain Res.** 24;134(1):170-9. 2005.

Fearnley, J.M., Lees, A.J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain** 114 (5): 2283–2301. 1991.

Fentress JC. The tonic hypothesis and the patterning of behavior. **Ann N Y Acad Sci.** 290:370-95. 1977.

Fernagut PO, Diguët E, Labattu B, Tison F. A simple method to measure stride length as an index of nigrostriatal dysfunction in mice. **J Neurosci Methods.** 113(2):123-30. 2002.

Fisher BE, Wu AD, Salem GJ, Song J, Lin CH, Yip J, Cen S, Gordon J, Jakowec M, Petzinger G. The effect of exercise training in improving motor performance and corticomotor excitability in people with early Parkinson's disease. **Arch Phys Med Rehabil.** 89(7):1221-9. 2008.

Fornaguera J, Schwarting RK. Early behavioral changes after nigrostriatal system damage can serve as predictors of striatal dopamine depletion. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 23(8):1353-68. 1999.

Fornaguera J, Schwarting RK. Time course of deficits in open field behavior after unilateral neostriatal 6-hydroxydopamine lesions. **Neurotox Res.** 4(1):41-9. 2002.

Fox CM, Gash DM, Smoot MK, Cass WA. Neuroprotective effects of GDNF against 6-OHDA in young and aged rats. **Brain Res.** 896 (1-2):56-63. 2001.

Franzini A, Cordella R, Messina G, Marras CE, Romito LM, Carella F, Albanese A, Rizzi M, Nardocci N, Zorzi G, Zekay E, Broggi G. Deep brain stimulation for movement disorders. Considerations on 276 consecutive patients. **J Neural Transm.** 118(10):1497-510. 2011.

Frazzitta G, Maestri R, Uccellini D, Bertotti G, Abelli P. Rehabilitation treatment of gait in patients with Parkinson's disease with freezing: a comparison between two physical therapy protocols using visual and auditory cues with or without treadmill training. **Mov Disord.** 24(8):1139-43. 2009.

Fredriksson A, Stigsdotter IM, Hurtig A, Ewalds-Kvist B, Archer T. Running wheel activity restores MPTP-induced functional deficits. **J Neural Transm.** 118(3):407-20. 2011.

Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neurosci Biobehav Rev.** 28(4):365-78. 2004.

Gage H, Hendricks A, Zhang S, Kazis L. The relative health related quality of life of veterans with Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 74(2):163-9. 2003.

Gibb WR, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 51(6):745-52. 1988.

Glinka Y, Gassen M, Youdim MB. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **J Neural Transm Suppl.** 50:55-66. 1997.

Glinka Y, Tipton KF, Youdim MB. Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine. **J Neurochem.** 66 (5): 2004-10. 1996.

Gomes da Silva S, de Almeida AA, Silva Araújo BH, Scorza FA, Cavalheiro EA, Arida RM. Early physical exercise and seizure susceptibility later in life. **Int J Dev Neurosci.** 29(8):861-5. 2011.

Gómez-Pinilla F, Ying Z, Roy RR, Molteni R, Edgerton VR. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **J Neurophysiol.** 88(5):2187-95. 2002.

Gomide V, Bibancos T, Chadi G. Dopamine cell morphology and glial cell hypertrophy and process branching in the nigrostriatal system after striatal 6-OHDA analyzed by specific stereological tools. **Int J Neurosci.** 115(4):557-82. 2005.

Goodwin VA, Richards SH, Taylor RS, Taylor AH, Campbell JL. The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord.** 15;23(5):631-40. 2008.

Gosal D, Ross OA, Toft M. Parkinson's disease: The genetics of a heterogeneous disorder. **Eur J Neurol.** 13:616-27. 2006.

Griesbach GS, Hovda DA, Gomez-Pinilla F, Sutton RL. Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. **Neuroscience.** 23;154(2):530-40. 2008.

Griesbach GS, Hovda DA, Gomez-Pinilla F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. **Brain Res.** 1288:105-15. 2009.

Grillner S, Wallén P, Saitoh K, Kozlov A, Robertson B. Neural bases of goal-directed locomotion in vertebrates--an overview. **Brain Res Rev.** 57 (1): 2-12. 2008.

Grillner S. Biological pattern generation: the cellular and computational logic of networks in motion. **Neuron.** 52(5):751-66. 2006.

Groves-Chapman JL, Murray PS, Stevens KL, Monroe DC, Koch LG, Britton SL, Holmes PV, Dishman RK. Changes in mRNA levels for brain-derived neurotrophic factor after wheel running in rats selectively bred for high- and low-aerobic capacity. **Brain Res.** 1425:90-7. 2011.

Halliday GM, McCann H. Human-based studies on alpha-synuclein deposition and relationship to Parkinson's disease symptoms. **Exp Neurol.** 209 (1):12-21. 2008.

Harries AM, Kausar J, Roberts SA, Mocroft AP, Hodson JA, Pall HS, Mitchell RD. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for

advanced Parkinson disease using general anesthesia: long-term results. **J Neurosurg.** 2011 Oct 14. [Epub ahead of print]

Henderson KK, Wagner H, Favret F, Britton SL, Koch LG, Wagner PD, Gonzalez NC. Determinants of maximal O₂ uptake in rats selectively bred for endurance running capacity. **J Appl Physiol.** 93(4):1265-74. 2002.

Hennigan A, O'Callaghan RM, Kelly AM Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. **Biochem Soc Trans.** 35(2):424-7. 2007.

Henning, J., Strauss, U., Wree, A., Gimsa, J., Rolfs, A., Benecke, R., Gimsa, U. Differential astroglial activation in 6-hydroxydopamine models of Parkinson's disease. **Neuroscience Research.** 62:246–253. 2008.

Herman T, Giladi N, Gruendlinger L, Hausdorff JM. Six weeks of intensive treadmill training improves gait and quality of life in patients with Parkinson's disease: a pilot study. **Arch Phys Med Rehabil.** 88(9):1154-8. 2007.

Hirai S, Cui de F, Miyata T, Ogawa M, Kiyonari H, Suda Y, Aizawa S, Banba Y, Ohno S. The c-Jun Nterminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex. **J. Neurosci.** 26:11992–12002. 2006.

Hirai S, Kawaguchi A, Suenaga J, Ono M, Cui DF, Ohno S. Expression of MUK/DLK/ZPK, an activator of the JNK pathway, in the nervous systems of the developing mouse embryo. **Gene Expr. Patterns.** 5:517–523. 2005.

Hoffert, L., Produção de fatores neurotróficos no sistema nervoso central de ratos submetidos à treinamento físico e à lesão por 6-hidroxidopamina. Dissertação. Mestrado em Biologia Celular, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. 2007.

Honea RA, Thomas GP, Harsha A, Anderson HS, Donnelly JE, Brooks WM, Burns JM. Cardiorespiratory fitness and preserved medial temporal lobe volume in Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord.** 23(3):188-97. 2009.

Howells FM, Russell VA, Mabandla MV, Kellaway LA. Stress reduces the neuroprotective effect of exercise in a rat model for Parkinson's disease. **Behav Brain Res.** 165(2):210-20. 2005.

Hussain SO, Barbato JC, Koch LG, Metting PJ, Britton SL. Cardiac function in rats selectively bred for low- and high-capacity running. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 281(6):R1787-91. 2001.

Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behav Brain Res.** 162(1):1-10. 2005.

Jáidar O, Carrillo-Reid L, Hernández A, Drucker-Colín R, Bargas J, Hernández-Cruz A. Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. **J Neurosci.** 25;30(34):11326-36. 2010.

Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 79(4):368-76. 2008.

Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. **Neurodegeneration.** 4(2):131-7. 1995.

Kametani H. Analysis of age-related changes in stress-induced grooming in the rat. Differential behavioral profile of adaptation to stress. **Ann N Y Acad Sci.** 525:101-13. 1988.

Kearns, C.M., W.A. Cass, K. Smoot, R. Kryscio, and D.M. Gash. GDNF protection against 6-OHDA: time dependence and requirement for protein synthesis. **J Neurosci.** 17:7111-8. 1997.

Kharatishvili I, Sierra A, Immonen RJ, Gröhn OH, Pitkänen A. Quantitative T2 mapping as a potential marker for the initial assessment of the severity of damage after traumatic brain injury in rat. **Exp Neurol.** 217 (1): 154-64. 2009.

Kidd, P.M. Integrated Brain Restoration after Ischemic Stroke – Medical Management, Risk Factors, Nutrients, and other Interventions for Managing Inflammation and Enhancing Brain Plasticity. **Alternative Medicine Review.** 14 (1). 2009.

Kim SH, Kim HB, Jang MH, Lim BV, Kim YJ, Kim YP, Kim SS, Kim EH, Kim CJ. Treadmill exercise increases cell proliferation without altering of apoptosis in dentate gyrus of Sprague-Dawley rats. **Life Sci.** 71(11):1331-40. 2002.

Kim ST, Son HJ, Choi JH, Ji IJ, Hwang O. Vertical grid test and modified horizontal grid test are sensitive methods for evaluating motor dysfunctions in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Brain Res.** 1306:176-83. 2010.

Kirik, D., C. Rosenblad, and A. Bjorklund. Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. **Eur J Neurosci.** 12:3871-82. 2000.

Knaepen K, Goekint M, Heyman EM, Meeusen R Neuroplasticity - exercise-induced response of peripheral brain-derived neurotrophic factor: a systematic review of experimental studies in human subjects. **Sports Med.** 40 (9):765-801. 2010.

Knott, C., G. Stern, A. Kingsbury, A.A. Welcher, and G.P. Wilkin. Elevated glial brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's diseased nigra. **Parkinsonism Relat Disord.** 8:329-41. 2002.

Kramer ER, Aron L, Ramakers GM, Seitz S, Zhuang X, Beyer K, Smidt MP, Klein R. Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system. **PLoS Biol.** 5(3):e39. 2007.

Kummer A, Teixeira AL. Neuropsychiatry of Parkinson's disease. **Arq Neuropsiquiatr.** 67(3B):930-9. 2009.

Lacerda AC, Rodrigues-Machado Mda G, Mendes PL, Novaes RD, Carvalho GM, Zin WA, Gripp F, Coimbra CC. Paraquat (PQ)-induced pulmonary fibrosis increases exercise metabolic cost, reducing aerobic performance in rats. **J Toxicol Sci.** 34(6):671-9. 2009.

Lei Z, Jiang Y, Li T, Zhu J, Zeng S. Signaling of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptor GFR α 1 induce Nurr1 and Pitx3 to promote survival of grafted midbrain-derived neural stem cells in a rat model of Parkinson disease. **J Neuropathol Exp Neurol.** 70(9):736-47. 2011.

Lent, Roberto. Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de Neurociência. 2. ed. São Paulo: **Atheneu**, 2010.

Levi-Montalcini, R. The nerve growth factor 35 years later. **Science.** 237:1154-62. 1987.

Levy R, Hazrati LN, Herrero MT, Vila M, Hassani OK, Mouroux M, Ruberg M, Asensi H, Agid Y, Féger J, Obeso JA, Parent A, Hirsch EC. Re-evaluation of the functional anatomy of the basal ganglia in normal and Parkinsonian states. **Neuroscience**. 76(2):335-43. 1997.

Limousin, P., Martinez-Torres, I. Deep Brain Stimulation for Parkinson's Disease. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**. 5:309–319.2008.

Lin, L.F., D.H. Doherty, J.D. Lile, S. Bektesh, and F. Collins. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science**. 260:1130-2. 1993.

Lindahl DA. Parkinson's: treating the symptoms. **Br J Nurs**. 20(14):852, 854-7. 2011.

Linkenhoker BA, von der Ohe CG, Knudsen EI. Anatomical traces of juvenile learning in the auditory system of adult barn owls. *Nat Neurosci*. 8 (1): 93-8. 2005.

Lončarević-Vasiljković, N., Pešić, V., Tanić, N., Milanović, D., Popić, J., Kanazir, S., Ruždijić, S. Changes in markers of neuronal and glial plasticity after cortical injury induced by food restriction. **Experimental Neurology**. 220: 198–206. 2009.

Mabandla, M., Kellaway, L., St Clair, Gibson A., Russell, V.A. Voluntary running provides neuroprotection in rats after 6-hydroxydopamine injection into the medial forebrain bundle. **Metab. Brain. Dis.** 19(1-2): 43-50. 2004.

Madinier, A., Bertrand, N., Mossiat, C., Prigent-Tessier, A., Beley, A., Marie, C., Garnier, P. Microglial Involvement in Neuroplastic Changes Following Focal Brain Ischemia in Rats. **PLoS ONE**. 4 (12). 2009.

Maraganore DM, Wilkes K, Lesnick TG, et al. A limited role for DJ1 in Parkinson disease susceptibility. **Neurology**. 63:550-53. 2004.

Martinez-Martin P, Arroyo S, Rojo-Abuin JM, Rodriguez-Blazquez C, Frades B, de Pedro Cuesta J. Longitudinal Parkinson's Disease Patient Study Group. Burden, perceived health status, and mood among caregivers of Parkinson's disease patients. **Mov Disord**. 23(12):1673-1680. 2008.

Marx FP, Holzmann C, Strauss KM, et al. Identification and functional characterization of a novel R621C mutation in the synphilin-1 gene in Parkinson's disease. **Hum Mol Genet**. 12:1223-31. 2003.

Matsumoto, T., T. Numakawa, D. Yokomaku, N. Adachi, S. Yamagishi, Y. Numakawa, H. Kunugi, and T. Taguchi. Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of glutamate and GABA release: different dependency on signaling pathways and neuronal activity. **Mol Cell Neurosci**. 31:70-84. 2006.

Mattson, M. P. e Magnus, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature Reviews**.7. 2008.

McGeer PL, McGeer EG. Glial reactions in Parkinson's disease. **Mov Disord**. 23(4):474-83. 2008.

Meredith GE, Kang UJ. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Mov Disord**. 21(10):1595-606. 2006.

Metz GA, Tse A, Ballermann M, Smith LK, Fouad K. The unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease revisited: an electromyographic and behavioural analysis. **Eur J Neurosci**. 22(3):735-44. 2005.

Meyer, F. Avaliação da saúde e aptidão física para recomendação de exercício em pediatria. **Rev Bras Med Esporte**. 5 (1). 1999.

Miklyaeva EI, Martens DJ, Whishaw IQ. Impairments and compensatory adjustments in spontaneous movement after unilateral dopamine depletion in rats. **Brain Res.** 681(1-2):23-40. 1995.

Misiak M, Beyer C, Arnold S. Gender-specific role of mitochondria in the vulnerability of 6-hydroxydopamine-treated mesencephalic neurons. **Biochim Biophys Acta.** 1797(6-7):1178-88. 2010.

Miyazaki, H., K. Nagashima, Y. Okuma, and Y. Nomura. Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats. **Brain Res.** 922:165-72. 2001.

Molteni, R., Z. Ying, and F. Gomez-Pinilla. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **Eur J Neurosci.** 16:1107-16. 2002.

Morris M, Iansek R, McGinley J, Matyas T, Huxham F. Three-dimensional gait biomechanics in Parkinson's disease: evidence for a centrally mediated amplitude regulation disorder. **Mov Disord.** 20(1):40-50. 2005.

Muangpaisan W, Mathews A, Hori H, Seidel D. A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. **J Med Assoc Thai.** 94(6):749-55. 2011.

Muir GD, Whishaw IQ. Ground reaction forces in locomoting hemiparkinsonian rats: a definitive test for impairments and compensations. **Exp Brain Res.** 126(3):307-14. 1999.

Nassar CC, Bondan EF, Alouche SR. Effects of aquatic exercises in a rat model of brainstem demyelination with ethidium bromide on the beam walking test. **Arq Neuropsiquiatr.** 67(3A):652-6. 2009.

Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman CW. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain Res.** 726(1-2):49-56. 1996.

Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, Adachi N, Richards M, Kunugi H. BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histol Histopathol.** 25(2):237-58. 2010.

Nussbaum RL, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **N Engl J Med.** 348(14):1356-64. 2003.

O'Dell SJ, Gross NB, Fricks AN, Casiano BD, Nguyen TB, Marshall JF. Running wheel exercise enhances recovery from nigrostriatal dopamine injury without inducing neuroprotection. **Neuroscience.** 144(3): 1141-51. 2007.

Parent A, Sato F, Wu Y, Gauthier J, Lévesque M, Parent M. Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. **Trends Neurosci.** 23(10):S20-7. 2000.

Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.** 14(2):223-36. 2002

Paxinos G and Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, San Diego. 2005.

Petzinger, G. M. e Jakowec, M. W. Animal Models of Basal Ganglia Injury and Degeneration and their Application to Parkinson's Disease Research. **Combined Sections Meeting.** Opryland, TN. 2004.

Pfrieger FW. Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. **Brain Res Rev.** 63(1-2):39-46. 2010.

Pietrelli A, Lopez-Costa J, Goñi R, Brusco A, Basso N. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. **Neuroscience.** 202: 252–266. 2012.

Ploughman M, Attwood Z, White N, Doré JJ, Corbett D. Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia. **Eur J Neurosci.** 25(11):3453-60. 2007.

Potashkin JA, Blume SR, Runkle NK. Limitations of animal models of Parkinson's disease. **Parkinsons Dis.** 2011:658083. 2010.

Poulton, N.P. and Muir, G.D. Treadmill training ameliorates dopamine loss but not behavioral deficits in hemi-parkinsonian rats. **Exp. Neurol.** 193(1):181-97. 2005.

Pringle JS, Doust JH, Carter H, Tolfrey K, Campbell IT, Sakkas GK, Jones AM. Oxygen uptake kinetics during moderate, heavy and severe intensity "submaximal" exercise in humans: the influence of muscle fibre type and capillarisation. **Eur J Appl Physiol.** 89(3-4):289-300. 2003.

Protas EJ, Mitchell K, Williams A, Qureshy H, Caroline K, Lai EC. Gait and step training to reduce falls in Parkinson's disease. **NeuroRehabilitation.** 20(3):183-90. 2005.

Rizelio V, Szawka RE, Xavier LL, Achaval M, Rigon P, Saur L, Matheussi F, Delattre AM, Anselmo-Franci JA, Meneses M, Ferraz AC. Lesion of the subthalamic nucleus reverses motor deficits but not death of nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Braz J Med Biol Res.** 43(1):85-95. 2010.

Rochester L, Hetherington V, Jones D, Nieuwboer A, Willems AM, Kwakkel G, Van Wegen E. The effect of external rhythmic cues (auditory and visual) on walking during a functional task in homes of people with Parkinson's disease. **Arch Phys Med Rehabil.** 86(5):999-1006. 2005.

Rosa EF, Takahashi S, Aboulafia J, Nouailhetas VL, Oliveira MG. Oxidative stress induced by intense and exhaustive exercise impairs murine cognitive function. **J Neurophysiol.** 98(3):1820-6. 2007.

Rosenblad, C., B. Georgievska, and D. Kirik. Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. **Eur J Neurosci.** 17:260-70. 2003.

Saarma, M., and H. Sariola. Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). **Microsc Res Tech.** 45:292-302. 1999.

Safi R, Gardaneh M, Panahi Y, Maghsoudi N, Zaefizadeh M, Gharib E. Optimized Quantities of GDNF Overexpressed by Engineered Astrocytes Are Critical for Protection of Neuroblastoma Cells Against 6-OHDA Toxicity. **J Mol Neurosci.** 2011.

Sage MD, Almeida QJ. Symptom and gait changes after sensory attention focused exercise vs aerobic training in Parkinson's disease. **Mov Disord.** 24(8):1132-8. 2009.

Schulz-Klaus B. Neurotoxic lesion of the rostral perirhinal cortex blocks stress-induced exploratory behavioral changes in male rats. **Stress.** 12(2):186-92. 2009.

Schwartz RK, Carey RJ. Differential behavioural effects after subtotal depletions of dopamine or noradrenaline in the ventral striatum. **Funct Neurol.** 3(1):29-36. 1988.

Siegel, G.J., Chauhan, N.B. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. **Brain Res. Brain Res. Rev.** 33, 199–227. 2000.

Skaper SD. The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. 7(1):46-62. 2008.

Smith MP, Cass WA. GDNF reduces oxidative stress in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**. 412 (3): 259-63. 2007.

Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. **Neuroscience**. 86:353-387.1998.

Spruijt BM, van Hooff JA, Gispen WH. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiol Rev**. 72(3):825-52. 1992.

Stahl K, Mylonakou MN, Skare Ø, Amiry-Moghaddam M, Torp R. Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson's disease. **Brain Res**. 10;1378:105-18. 2011.

Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T, Kondo A, Yuan W, Kadota T, Wang F, Baba T, Tayra JT, Morimoto T, Jing M, Kikuchi Y, Kuramoto S, Agari T, Miyoshi Y, Fujino H, Obata F, Takeda I, Furuta T, Date I. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. **Brain Res**. 1310:200-7. 2010.

Takahashi H, Wakabayashi K. The cellular pathology of Parkinson's disease. **Neuropathology**. 21(4):315-22. 2001.

Thiriet N, Amar L, Toussay X, Lardeux V, Ladenheim B, Becker KG, Cadet JL, Solinas M, Jaber M. Environmental enrichment during adolescence regulates gene expression in the striatum of mice. **Brain Res**. 1222: 31–41. 2008.

Thoenen, H., Y.A. Barde, A.M. Davies, and J.E. Johnson. Neurotrophic factors and neuronal death. **Ciba Found Symp**. 126:82-95. 1987.

Tillerson JL, Cohen AD, Philhower J, Miller GW, Zigmond MJ, Schallert T. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. **J Neurosci**. 21(12):4427-35. 2001.

Trejo, J.L., E. Carro, and I. Torres-Aleman. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. **J Neurosci**. 21:1628-34. 2001.

Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol**. 5(1):107-10. 1968.

Vaynman, S., and F. Gomez-Pinilla. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. **Neurorehabil Neural Repair**. 19:283-95. 2005.

Vaynman, S.S., Z. Ying, D. Yin, and F. Gomez-Pinilla. Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. **Brain Res**. 1070:124-30. 2006.

Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. **Lancet Neurol**. 10(11):1015-25. 2011.

Wang JS, Huang YH. Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. **Eur J Appl Physiol**. 95(4):290-7. 2005.

Waters RP, Renner KJ, Pringle RB, Summers CH, Britton SL, Koch LG, Swallow JG. Selection for aerobic capacity affects corticosterone,

monoamines and wheel-running activity. **Physiol Behav.** 93(4-5):1044-54. 2008.

Winkler, C., H. Sauer, C.S. Lee, and A. Bjorklund. Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. **J Neurosci.** 16:7206-15. 1996.

Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol.** 26 Suppl 1:S1-58. 2011.

Ying, Z., R.R. Roy, V.R. Edgerton, and F. Gomez-Pinilla. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. **Exp Neurol.** 193:411-9. 2005.

Yoon MC, Shin MS, Kim TS, Kim BK, Ko IG, Sung YH, Kim SE, Lee HH, Kim YP, Kim CJ. Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Neurosci Lett.** 423(1):12-7. 2007.

Yurek, D.M., and A. Fletcher-Turner. Differential expression of GDNF, BDNF, and NT-3 in the aging nigrostriatal system following a neurotoxic lesion. **Brain Res.** 891:228-35. 2001.

Zigmond MJ, Cameron JL, Leak RK, Mirnics K, Russell VA, Smeyne RJ, Smith AD. Triggering endogenous neuroprotective processes through exercise in models of dopamine deficiency. **Parkinsonism Relat Disord.** 15 Suppl 3:S42-5. 2009.

Zoladz, J.A., Pilc, A. Majerczak, J., Grandys, M., Zapart-Bukowska, J. Duda, K. Endurance training increases plasma brain-derived Neurotrophic factor concentration in young healthy men. **Journal of Physiology and Pharmacology.** 59 (7):119–132. 2008.

Zuch CL, Nordstroem VK, Briedrick LA, Hoernig GR, Granholm AC, Bickford PC. Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. **J Comp Neurol.** 427(3):440-54. 2000.