

**Roseane Marques Ribeiro**

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, ESTRUTURAIS E  
NÍVEIS DE FATORES NEUROTRÓFICOS E CITOCINAS  
EM MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO:  
EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO**

**Universidade Federal De Minas Gerais**

**Belo Horizonte**

**2013**

Roseane Marques Ribeiro

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, ESTRUTURAIS E  
NÍVEIS DE FATORES NEUROTRÓFICOS E CITOCINAS  
EM MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO:  
EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Elizabeth Ribeiro da Silva

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Luciana Scalzo

Universidade Federal De Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte

2013

Dissertação realizada no laboratório Prof.<sup>a</sup> Conceição Machado do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob a orientação das Prof.<sup>as</sup> Dra. Elizabeth Ribeiro da Silva e co-orientação da Prof.<sup>a</sup> Dra. Paula Luciana Scalzo 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).

“A menina de preto ficou morando atrás do tempo, sentada no banco, debaixo da árvore, recebendo todo o céu nos seus grandes olhos admirados.”

Cecília Meireles, 1927

À minha mãe, pela doação e amor incondicionais, por sonhar meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela coincidências/providências que realizou, sempre.

À minha mãe por sempre me fazer acreditar que a estrada vai além do que se vê.

À minha família linda, minha base, meu refúgio, meu acalanto e meu desassossego.

Ao Douglas pela compreensão, pelo amor tão devotado e por acreditar em mim mais do que eu mesma.

Aos meus grandes amigos que me ajudaram a seguir.

À minha orientadora professora Elizabeth por me possibilitar realizar um trabalho tão bonito, por acreditar que eu seria capaz de fazê-lo, por me ensinar a ser pesquisadora, acreditar e descobrir a ciência básica. Pela compreensão das minhas capacidades e limitações. Pelo companheirismo e amizade.

À minha co-orientadora professora Paula por sempre trazer um novo ponto de vista às situações, pelo apoio, pela amizade, pelos longos debates de dúvidas e trivialidades da vida.

À professora Patrícia Martinelli pela presença, paciência e cuidado, pelas conferências intermináveis, por responder todas as dúvidas corriqueiras e por confiar em mim.

Aos amigos do lab e ic's pelo companheirismo e amizade sincera, por toda a ajuda, pelas ideias, por abraçarem este projeto junto comigo. Pelas risadas e *happy-hours*. Este trabalho também é de vocês.

Ao pessoal da pós-biocel que torceram por mim, principalmente Sheila e Diana que me ajudaram demais. Aos professores Fabrício Moreira, Antônio Lúcio Teixeira, Helton Reis e Cândido Coimbra e a seus alunos pelas disponibilidade, ideias e apoio.

À equipe do laboratório de neurofarmacologia das doenças neurodegenerativas da UFSC pela instrução, acolhimento e disponibilidade sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
1.1 Dados epidemiológicos da doença de Parkinson .....	18
1.2 Breve histórico sobre a doença de Parkinson .....	19
1.3 Sistema dopaminérgico modulador da motricidade voluntária .....	20
1.4 Etiologia da doença de Parkinson .....	23
1.5 Manifestações clínicas da doença de Parkinson .....	25
1.6 Alterações histopatológicas e moleculares da doença de Parkinson .....	27
1.6.1 Células da glia e doença de Parkinson .....	28
1.6.2 Neurodegeneração e neuroinflamação na doença de Parkinson .....	30
1.6.3 Unidade neurovascular e barreira hematoencefálica.....	32
1.7 Modelos experimentais da doença de Parkinson .....	35
1.7.1 Modelo experimental da doença de Parkinson por administração de 1- Metil- 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina-hidroclorido – MPTP.....	36
1.8 Exercício físico .....	39
1.9 Fatores neurotróficos .....	43
1.9.1 GDNF .....	43
1.9.2 BDNF.....	45
2 OBJETIVOS .....	48
2.1 Objetivo geral .....	49
2.2 Objetivos específicos .....	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS.. .....	50

3.1 Animais.....	51
3.2 Aclimação à esteira e avaliação de desempenho aeróbico por esforço progressivo .....	51
3.3 Treinamento em esteira .....	52
3.4 Teste comportamental em campo aberto .....	53
3.5 Infusão intranasal de MPTP .....	54
3.6 Eutanásia .....	55
3.7 Dosagem de fatores neurotróficos e citocinas (ELISA- <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ) .....	56
3.8 Microscopia eletrônica .....	57
3.9 Análise estatística.....	57
3.10 Delineamento experimental .....	57
4 RESULTADOS .....	59
4.1 Peso corporal dos animais ao longo do período experimental .....	60
4.2 Parâmetros relativos ao treinamento físico em esteira .....	60
4.3 Avaliação de comportamento motor pelo teste de campo aberto de animais sedentários e exercitados por 30 dias em esteira .....	62
4.4 Níveis de fatores neurotróficos no sistema nigroestriatal em resposta ao treinamento em esteira .....	65
4.4.1 Níveis de GDNF .....	65
4.4.2 Níveis de BDNF .....	66
4.5 Níveis de citocinas no sistema nigroestriatal em resposta ao treinamento em esteira .....	67
4.5.1 Níveis de TNF- $\alpha$ .....	67
4.5.2 Níveis de Interleucina 1 $\beta$ .....	68
4.5.3 Níveis de Interleucina 6 .....	69
4.5.4 Níveis de Interleucina 10 .....	70

4.6 Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre o comportamento em campo aberto de animais sedentários e exercitados em esteira após a infusão de MPTP ou salina .....	71
4.7 Efeitos da infusão intranasal de MPTP sobre neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral.....	79
4.8 Níveis de fatores neurotróficos no sistema nigroestriatal .....	82
4.8.1 Níveis de GDNF .....	82
4.8.2 Níveis de BDNF .....	82
4.9 Níveis de citocinas no sistema nigroestriatal .....	84
4.9.1 Níveis de TNF- $\alpha$ .....	84
4.9.2 Níveis de Interleucina 1 $\beta$ .....	85
4.9.3 Níveis de Interleucina 6 .....	87
4.9.4 Níveis de Interleucina 10 .....	88
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....	89
5.1 Treinamento físico em esteira e alterações comportamentais .....	90
5.2 Influência do treinamento físico sobre os níveis de fatores neurotróficos..	93
5.3 Influência do treinamento físico sobre os níveis de citocinas .....	94
5.4 Modelo experimental de indução de parkinsonismo por infusão intranasal de MPTP .....	96
5.5 Influência da infusão de MPTP sobre os níveis de fatores neurotróficos..	99
5.6 Influência da infusão de MPTP sobre os níveis de citocinas .....	101
5.7 Conclusão e perspectivas futuras .....	102
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxidopamina
Akt	Serina/treonina quinase
ATV	Área tegumentar ventral
Bax	Bcl-2 associado à proteína X - subfamília pró-apoptótica
Bcl-2	Linfoma de célula B-2 subfamília anti-apoptótica
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
CD (4+,8+, 23, 45)	<i>Cluster</i> de diferenciação
D (1-5)	Receptores de dopamina
DAT	Transportador de dopamina
EM	Exercitado MPTP
ES	Exercitado salina
Fas	Receptor de apoptose Fas
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
GFR $\alpha$ 1-3	Receptor $\alpha$ da família do GDNF
GFL	Família de ligantes de GDNF
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-(1 $\beta$ , 2, 4, 6, 10)	Interleucina
IP <sub>3</sub>	Inositol tri-fosfato
JNK	c-Jun N-terminal quinase
MAO (A-B)	Monoamina oxidase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MET	Equivalente metabólico
MMP 1,3 e 9	Metaloproteinase de matriz
MPDP <sup>+</sup>	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridium

MPP <sup>+</sup>	1-metil 4-piridinium
MPTP	1-metil 4-fenil-12,3, 6-tetrahidropiridina
NF- $\kappa$ b	Fator nuclear kappa-cadeia-leve potenciador de células B ativadas
NGF	Fator de crescimento de nervo
NT-3, 4/5	Neurofinas
OMS	Organização Mundial de Saúde
p38	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
p53	Gene supressor de tumor
p55	Receptor de TNF- $\alpha$
p75	Receptor neurotrófico de baixa afinidade
PARK-(1-8)	Gene relacionado à doença de Parkinson
PLC	Fosfolipase C
PI3K	Fosfatidilinositol 3 kinase
Ras	GTPase monomérica da família Ras
RET	Receptor tirosina quinase
ROS	Radicais livres de oxigênio
SM	Sedentário MPTP
SN	Substância negra
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	Substância negra parte compacta
SOD (Mn-SOD, Cu-Zn SOD)	Superóxido dismutase associada a manganês ou cobre e zinco
SS	Sedentário salina
TGF ( $\alpha$ e $\beta$ )	Fator de crescimento transformante
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral
Trk (A-C)	Receptor do tipo tirosina quinase
V média	Velocidade média

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organização funcional dos circuitos dos núcleos da base relacionada à motricidade voluntária: vias direta e indireta .....	22
<b>Figura 2.</b> Possíveis interrelações dos fatores envolvidos no desenvolvimento/progressão da Doença de Parkinson .....	34
<b>Figura 3.</b> Ilustração esquemática da via de entrada e possíveis mecanismos moleculares envolvidos na morte neuronal induzida por MPTP.....	39
<b>Figura 4.</b> Vias de sinalização de BDNF e GDNF.....	47
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática da infusão intranasal.....	55
<b>Figura 6.</b> Peso corporal médio dos animais exercitados (E) e sedentários (S) durante o período experimental .....	60
<b>Figura 7.</b> Avaliação de desempenho aeróbico submáximo.....	61
<b>Figura 8.</b> Velocidade média em dois períodos de treinamento em esteira....	61
<b>Figura 9:</b> Número de quadrantes cruzados por animais sedentários e exercitados.....	63
<b>Figura 10:</b> Número de rearing em animais sedentários e exercitados .....	63
<b>Figura 11:</b> Tempo ativo de animais sedentários e exercitados .....	63
<b>Figura 12:</b> Tempo de <i>rearing</i> em animais sedentários e exercitados .....	63
<b>Figura 13:</b> Latência para realização do primeiro <i>rearing</i> em animais sedentários e exercitados .....	63
<b>Figura 14:</b> Velocidade média de animais sedentários e exercitados.....	63
<b>Figura 15:</b> Distância percorrida por animais sedentários e exercitados.....	64
<b>Figura 16:</b> Velocidade máxima de animais sedentários e exercitados.....	64
<b>Figura 17:</b> Tempo de <i>freezing</i> de animais sedentários e exercitados.....	64
<b>Figura 18:</b> Número de <i>grooming</i> de animais sedentários e exercitados.....	64
<b>Figura 19:</b> Tempo de <i>grooming</i> de animais sedentários e exercitados.....	64
<b>Figura 20:</b> Latência de <i>grooming</i> de animais sedentários e exercitados.....	64

<b>Figura 21:</b> Níveis de GDNF em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina .....	66
<b>Figura 22:</b> Níveis de BDNF em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.....	66
<b>Figura 23:</b> Níveis de BDNF em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina .....	67
<b>Figura 24:</b> Níveis de TNF- $\alpha$ em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.....	67
<b>Figura 25:</b> Níveis de TNF- $\alpha$ em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.....	68
<b>Figura 26:</b> Níveis de IL-1 $\beta$ em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.....	68
<b>Figura 27:</b> Níveis de IL-1 $\beta$ em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina .....	69
<b>Figura 28:</b> Níveis de IL-6 em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina .....	69
<b>Figura 29:</b> Níveis de IL-6 em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.....	70
<b>Figura 30:</b> Níveis de IL-10 em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.....	71
<b>Figura 31:</b> Distância percorrida de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP .....	75
<b>Figura 32:</b> Número de quadrantes cruzados por animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP .....	75
<b>Figura 33:</b> Velocidade máxima de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP .....	75
<b>Figura 34:</b> Tempo ativo de animais sedentários ou exercitados submetidos	

ou não à infusão de MPTP .....	76
<b>Figura 35:</b> Tempo de freezing de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP.....	76
<b>Figura 36:</b> Número de rearing de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP .....	76
<b>Figura 37:</b> Tempo de rearing de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP .....	77
<b>Figura 38:</b> Número de grooming de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP .....	77
<b>Figura 39:</b> Latência ao primeiro grooming de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP .....	77
<b>Figura 40:</b> Velocidade média de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP .....	78
<b>Figura 41:</b> Latência ao primeiro rearing de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP .....	78
<b>Figura 42:</b> Tempo de grooming de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP .....	78
<b>Figura 43:</b> Ultraestrutura de mesencéfalo ventral de animais sedentários aos 4 dias após infusão de salina .....	80
<b>Figura 44:</b> Ultraestrutura de mesencéfalo ventral de animais sedentários aos 42 dias após infusão de MPTP .....	81
<b>Figura 45:</b> Níveis de GDNF em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina .....	82
<b>Figura 46:</b> Níveis de BDNF no estriado em ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.....	83
<b>Figura 47:</b> Níveis de BDNF em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina ....	84

<b>Figura 48:</b> Níveis de TNF- $\alpha$ no estriado em ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina .....	84
<b>Figura 49:</b> Níveis de TNF- $\alpha$ em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.....	85
<b>Figura 50:</b> Níveis de IL-1 $\beta$ no estriado em ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina .....	86
<b>Figura 51:</b> Níveis de IL-1 $\beta$ em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina .....	86
<b>Figura 52:</b> Níveis de IL-6 no estriado em ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina .....	87
<b>Figura 53:</b> Níveis de IL-6 em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.....	88
<b>Figura 54:</b> Níveis de IL-10 no estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina .....	88
<b>Figura 55:</b> Representação esquemática da ação do MPTP sobre disfunção mitocondrial .....	98
<b>Figura 56:</b> Representação esquemática da resposta celular ao exercício físico .....	98

## RESUMO

O envelhecimento da população mundial e o conseqüente aumento da incidência e prevalência de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, empresta relevância aos estudos que visam conhecer os mecanismos subjacentes a essa doença. Na doença de Parkinson há morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra do mesencéfalo gerando sintomas motores e não motores. Investigou-se o efeito neuroprotetor de treinamento físico prévio em esteira realizado por 30 dias consecutivos em intensidade moderada em ratos Holtzman machos submetidos ao modelo de infusão intranasal de MPTP, neurotoxina específica para esses neurônios. Os resultados mostram que o treinamento aeróbico melhorou a aptidão física observada pelo aumento de velocidade e distância desenvolvidas. Ademais, o treinamento em esteira aumentou a curiosidade exploratória em campo aberto, evidenciada pelo aumento de número de quadrantes cruzados, velocidade média, e número e tempo de *rearing*. Também observamos aumento nos níveis de BDNF no mesencéfalo ventral e diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 no estriado. Já a lesão induzida por MPTP diminui a curiosidade exploratória em campo aberto – expresso pela diminuição do número de quadrantes cruzados, velocidade máxima alcançada, tempo ativo, número e tempo de *rearings*, número de *grooming*, aumento do tempo de *freezing* a partir de 21 dias pós-infusão. Além disso, o tratamento como MPTP gera alterações estruturais - morte de neurônios dopaminérgicos, alteração de astrócitos e do complexo gliovascular em mesencéfalo ventral -, bem como elevação dos níveis estriatais de BDNF e diminuição de GDNF e TNF- $\alpha$  em mesencéfalo ventral. Os animais submetidos ao treinamento aeróbico prévio e ao MPTP não apresentaram déficit locomotor, mas sim um aumento de curiosidade exploratória 31 dias pós-infusão. Assim, conclui-se que o modelo de infusão intranasal de MPTP gera alterações comportamentais, estruturais e bioquímicas no sistema nigroestriatal e que o treinamento aeróbico em esteira atenuou o desenvolvimento do parkinsonismo.

**Palavras chave:** doença de Parkinson, MPTP, intranasal, treinamento em esteira, fatores neurotróficos, citocinas, campo aberto.

## ABSTRACT

The ageing of global population and the increase in incidence and prevalence of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, highlight the importance of studies that aim to understand the underlying mechanisms of this disease. In e Parkinson's disease there is dopaminergic neurons death especially in the substantia nigra midbrain generating motors and no motors symptoms. In this study we investigated whether previous aerobic training on a treadmill for 30 consecutive days at a moderate intensity and individualized speed could have neuroprotective effects in male Holtzman rats under an MPTP experimental model through intranasal infusion, neurotoxin specific to those neurons. The results show that physical exercise could improve physical fitness observed by increased speed and distance travelled. Besides, treadmill exercise was able to raise open field exploratory activity evidenced by increase in number of quadrants crossed, speed average, rearing number and duration. We also observed increased BDNF levels in the ventral midbrain, and decreases TNF- $\alpha$  and IL-10 levels in striatum. Furthermore, the lesion induced by MPTP decreases open field exploratory curiosity, reducing the number of quadrants crossed, maximum speed, active time, rearings number and duration, number of grooming, and increases the freezing time from 21 days post-infusion on. MPTP generates structural changes such as death of dopaminergic neurons, astrocytes and gliovascular unit alterations in the ventral midbrain, as well as striatal BDNF elevation, GDNF and TNF - $\alpha$  decreasing in ventral midbrain. The animals subjected to aerobic exercise showed no locomotor deficits, but an increase of exploratory curiosity 31 days post-infusion. Thus, we think that intranasal infusion of MPTP produces behavioral, structural and biochemical changes in nigrostriatal system and aerobic exercise treadmill can prevent / attenuate the development of parkinsonism.

**Keywords:** Parkinson's disease, MPTP, intranasal, treadmill exercise, neurotrophic factors, cytokines, open field.

## **1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

## 1 Introdução e Justificativa

### 1.1 Dados Epidemiológicos da Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em humanos (OMS, 2008) sendo precedida apenas pela doença de Alzheimer. Segundo a OMS (2008), a doença de Parkinson atinge 2% dos indivíduos com idade superior a 65 anos, mas esta prevalência pode estar subestimada e de fato estaria entre 10 a 13% desta população (Muangpaisan *et al.*, 2011). A doença de Parkinson apresenta distribuição homogênea entre grupos étnicos e classes socioeconômicas (Dorsey *et al.*, 2007) e maior propensão ao acometimento de indivíduos do sexo masculino (Baumann, 2012; Leibson *et al.*, 2006; Wooten *et al.*, 2004). Com relação à mortalidade, após o diagnóstico da doença, a expectativa de morte praticamente dobra quando comparada a população base (Marras & Lang, 2008) e acredita-se que em 2040 a doença de Parkinson será a segunda causa de morte mais comum, superando casos de neoplasia maligna (OMS, 2004a).

No Brasil não existem dados epidemiológicos sobre a doença de Parkinson disponíveis em agências oficiais. Estima-se que corresponde a aproximadamente 70% das síndromes parkinsonianas, caracterizadas por desordem de movimentos (Cardoso *et al.*, 1998). Em estudo epidemiológico único no Brasil, Barbosa *et al.* (2006), observaram que 3,3% da população é acometida por doença de Parkinson. É relevante que, neste estudo, 72% dos casos diagnosticados não haviam sido identificados previamente pelo sistema de saúde local.

Sabendo-se que a incidência da doença de Parkinson aumenta com o envelhecimento - principal fator de risco - faz-se interessante analisar alguns dados sobre a população idosa brasileira. Em números oficiais, a expectativa de vida média ao nascer é de 73 anos e, para quem já alcançou 60 anos, é de 21,3 anos adicionais. No Brasil, os idosos representam 9,9% da população e o índice de envelhecimento é de 37,9% (IDB, 2009). Estima-se que no ano de 2020, a população idosa poderá exceder 30 milhões de pessoas, alcançando aproximadamente 13% da população brasileira (IBGE, 2000). A população brasileira de idosos é maior no sudeste e menor no nordeste, apresenta escolaridade de ensino fundamental incompleto, mora em domicílios próprios, sozinhos ou com até

duas pessoas, sendo estes o cônjuge e/ou o filho (a), é formada por indivíduos aposentados tendo renda de dois à cinco salários mínimos, e é usuária do sistema público de saúde (IDB, 2009; IBGE, 2000).

O impacto da doença de Parkinson nos sistemas de saúde mundial é substancial, alcançando o gasto estimado de US\$ 11 bilhões em 2004 (OMS, 2004b). As despesas mais que dobram quando compara-se paciente parkinsoniano ao não parkinsoniano (Leibson *et al.*, 2006). O dispêndio aumenta proporcionalmente a evolução da doença (Lindgren, 2004) porque o paciente com doença de Parkinson apresenta 1.4 vezes mais admissões hospitalares, 1.2 vezes internações mais longas, 1.4 vezes gastos mais altos com médicos e 3 vezes gastos maiores com medicação (Guttman *et al.*, 2004). Ainda há gastos intangíveis como diminuição da produtividade ou aumento do absenteísmo no trabalho por parentes de indivíduos com doença de Parkinson (Dowding *et al.*, 2006). A prevenção e mesmo a alteração da progressão da doença de Parkinson são formas de melhorar a condição de cada paciente e diminuir significativamente os gastos com a doença (Lindgren, 2004).

## 1.2 Breve histórico sobre a Doença de Parkinson

Em interessante revisão, Goetz (2011) refere-se a relatos indianos e chineses datados de 1000 A.C., assim como aos relatos de Sylvius de la Boë (1680) e Sauvages (1768) sobre a ocorrência de tremores de repouso e festinação em pacientes, provavelmente relacionados à doença de Parkinson. Em 1817, James Parkinson cunhou o termo “paralisia agitante” (*shaking palsy*) para descrever casos clínicos em que os pacientes apresentavam dificuldade de mobilidade associada a tremor (Calne, 2005). Parkinson tem o mérito reconhecido de ter associado, sob única nosologia, seis casos clínicos com sintomas e prognóstico semelhantes (Parkinson, 1817, republicado em 2002).

A descrição original de James Parkinson se segue:

*The first symptoms perceived are, a slight sense of weakness, with a proneness to trembling in some particular part; sometimes in the head, but most commonly in one of the hands and arms. These symptoms gradually*

*increase in the part first affected and less than twelve months or more, the morbid influence is felt in some other part [...] and suffers a similar loss of power [...] After a few more months the patient is found to be less strict than usual in preserving an upright posture [...] Walking becomes a task which cannot be performed without considerable attention. [...] But as the disease proceeds, difficulties increase: writing can now be hardly at all accomplished; and reading, from the tremulous motion, is accomplished with some difficulty. In this stage, the sleep becomes much disturbed, with slight delirium, the bowels, demand stimulating medicines of very considerable power. [...] (Parkinson, 1817 reprinted 2002).*

Mais tarde, no século XIX, Charcot (1872) cunhou o nome “*La maladie de Parkinson*”, em reconhecimento ao trabalho clínico de James Parkinson, e descreveu outros tipos de parkinsonismos (revisão em Teive, 1998). No final do século XIX e início do XX, Charcot já havia definido e determinado os quatro sinais cardinais, os sintomas associados – como disartria, disfagia e alterações autonômicas - e propôs o primeiro tratamento farmacológico para a doença (Teive, 1998). A alteração da substância negra (SN) do mesencéfalo foi proposta por Brissau (1925) e as áreas de lesão cerebral foram descritas por Greenfield e Bosanquet em 1953 (Goetz, 2011).

### **1.3 Sistema dopaminérgico modulador da motricidade voluntária**

O neurotransmissor essencial para as atividades do sistema modulador da motricidade voluntária (via nigroestriatal) é a dopamina. No sistema nervoso central (SNC) esse neurotransmissor também é importante no sistema de recompensa e motivação (via mesolímbica e mesocortical) e no sistema regulador de secreção hormonal do eixo hipotalâmico-hipofisário. A dopamina está relacionada, também, com o sistema nervoso autônomo simpático, em uma via descendente hipotalâmica (Kandel, 2000).

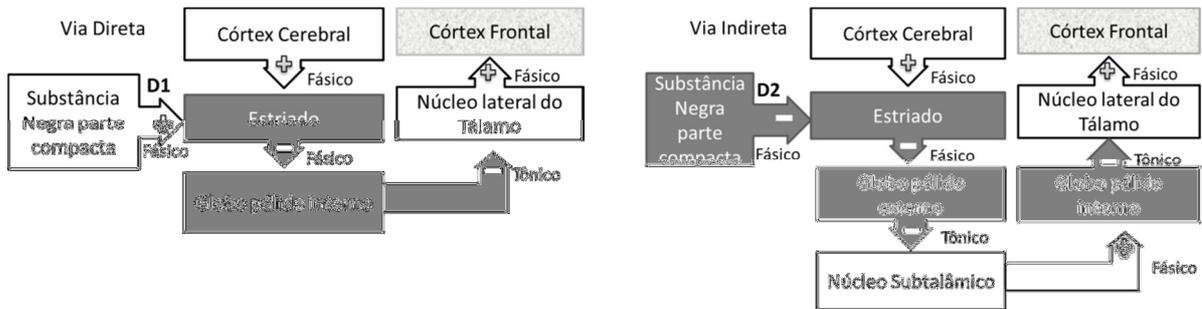
A dopamina é liberada na fenda sináptica por exocitose ou por ação reversa de seu transportador DAT. Uma vez liberada, a dopamina não sofre degradação na fenda sináptica. Sua recaptação para o interior da terminação dopaminérgica é feita pelo DAT e pode ser degradada por duas enzimas: uma mitocondrial - a monoamina oxidase (MAO) - e outra citoplasmática - a catecol-O-metil transferase (COMT). Como resultado da degradação formam-se 3,4-ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) (Purves *et al.*, 2004, Saper, 2000).

Os receptores dopaminérgicos são metabotrópicos acoplados a proteína G. Os receptores são divididos em duas famílias: D1-subdividida em D1 e D5 (outra denominação possível seria D1a e D1b, respectivamente) - e D2 – subdividido em receptores D2, D3 e D4 e seus homólogos -, de acordo com suas características bioquímicas, fisiológicas e estruturais. Basicamente, a família D1 faz sinapses excitatórias – por estar acoplada a proteína G estimulatória - e a D2 inibitórias – por estar acoplada a proteína G inibitória -, com função de *auto-feedback* (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Saper, 2000).

Do ponto de vista funcional, os núcleos da base abrangem o estriado - composto pelos núcleos caudado e putamen - globo pálido, núcleo subtalâmico e substância negra. O estriado constitui a principal aferência dos núcleos da base, recebendo eferências glutamatérgicas de todas as áreas do córtex cerebral, excetuando áreas auditiva e visual primárias, formando a via córtico-estriatal responsável pelo planejamento e intenção de mover-se. As eferências glutamatérgicas do núcleo intralaminar do tálamo, dopaminérgica da parte compacta da substância negra (SNpc) e serotoninérgica do núcleo da rafe modulam esta via córtico-estriatal. Já as eferências dos núcleos da base estão envolvidas em duas vias de controle da motricidade voluntária, a via direta e a indireta (Fig. 1). A via direta é responsável pela desinibição do tálamo e consequente facilitação da iniciação do movimento. Já a via indireta é responsável pela modulação dos padrões de movimento (Purves *et al.*, 2004).

A partir de uma eferência cortical glutamatérgica e adjunta à liberação de dopamina pela SNpc, que age sobre receptores D1 da coluna medial de neurônios estriatais, o estriado ativa suas projeções gabaérgicas para o globo pálido interno. O globo pálido interno então fica inibido e deixa de exercer sua ação tônica gabaérgica sobre

os núcleos laterais do tálamo, que tornando-se ativos, projetam suas eferências glutamatérgicas para as áreas motoras corticais. Assim, o movimento se inicia. (Purves *et al.*, 2004).



**Figura 1:** Organização funcional dos circuitos dos núcleos da base relacionada à motricidade voluntária: vias direta e indireta.

A eferência cortical glutamatérgica adjunta à liberação de dopamina pela SNpc, que age sobre os receptores D2 da coluna medial de neurônios estriatais, faz com que o estriado ative suas projeções gabaérgicas para globo pálido externo. O globo pálido externo é então inibido e deixa de exercer sua função tônica gabaérgica sobre o núcleo subtalâmico. Este então, através de suas projeções glutamatérgicas, ativa novamente o globo pálido externo que volta a inibir o núcleo lateral do tálamo, que não fará mais eferências excitatórias para as áreas motoras corticais (Surmeier *et al.*, 2011; DeLong, 2000).

A motricidade normal depende do balanço entre as vias direta e indireta no estriado e no globo pálido. Na doença de Parkinson, a morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc induz superativação da via indireta e hipoativação da via direta, tendo em vista sua ação como modulador da eferência excitatória glutamatérgica cortical. Na via direta, a dopamina agiria em conjunto com o glutamato excitando o estriado. Na via indireta, agiria sobre receptores D2 e modularia o *input* excitatório cortical. Esta ação sobre o estriado é que altera diretamente o *input* inibitório dos núcleos da base e sua consequente ação sobre o tálamo. Desta forma, há a tendência de manter-se inibido os núcleos laterais do tálamo em diferentes graus e assim haver dificuldade na iniciação do movimento voluntário, criando as síndromes clínicas hipocinéticas, em que se inclui a doença de Parkinson (Surmeier *et al.*, 2011).

Além do circuito motor, os núcleos da base estão envolvidos em outros circuitos neuronais, como o circuito pré-frontal – envolvido em processos cognitivos -, o circuito límbico – relacionado a comportamento e motivação -, o circuito óculomotor – associado ao controle do movimento dos olhos (Surmeier *et al.*, 2011; Purves *et al.*, 2004, De Long, 2000).

#### **1.4 Etiologia da Doença de Parkinson**

O desenvolvimento da doença de Parkinson é resultante de uma cascata multifatorial onde interagem a susceptibilidade genética, a exposição a fatores ambientais de risco e a senescência (Yang & Lu, 2009), influenciados pelo estilo de vida e compleição física (Abbott *et al.*, 2003).

De acordo com Eriksen *et al.* (2005), 10% dos casos dessa doença são de origem genética. Hoje, 13 *loci* (PARK) são reconhecidos e identificados como relacionados ao desenvolvimento da doença de Parkinson. Desses, sete são atribuídos a formas familiares e quatro à forma esporádica da doença (Yang & Lu, 2009).

As mutações autossômicas dominantes ocorrem nos genes PARK1, PARK4, PARK5 e PARK8. A mutação no gene PARK1 altera a proteína  $\alpha$ -sinucleína que deixa de ser solúvel e tende a se agregar de forma filamentosa, constituindo os corpos de Lewy característicos da doença de Parkinson (Nagatsu & Sawada, 2005). O gene PARK5 codifica a proteína UCHL-1 (ubiquitina C-terminal hidrolase L1) que participa de uma via proteolítica ubiquitina-dependente. Sua mutação leva a redução de sua função catalítica e conseqüente aumento de agregação proteica (Leroy *et al.*, 1998). A mutação mais comum associada à doença de Parkinson familiar e também à idiopática é a mutação em PARK8 que leva à alteração de LRRK2 (*leucine-rich repeat kinase 2*). Esta proteína é uma GTPase/quinase que aparenta estar envolvida em cascatas de sinalização celular relevante a neurodegeneração e apoptose na doença de Parkinson e na formação/manutenção de corpos de Lewy (Dauer & Ho, 2010).

As mutações autossômicas recessivas mais comuns encontram-se nos genes PARK2, PARK6 e PARK7, e estão relacionadas à forma juvenil de doença de Parkinson (Cook *et al.*, 2003). Mutações em PARK2 geram alteração da proteína

Parkin que é um sistema ubiquitina-proteossoma (Nagatsu & Sawada, 2005). A mutação em PARK6 gera alteração na proteína quinase mitocondrial PINK1 (*putative serine threonine kinase*). Essa foi a primeira proteína mitocondrial envolvida na patofisiologia da doença de Parkinson. Em condições fisiológicas, parece preservar a mitocôndria em resposta ao estresse celular (Valente *et al.* 2004). O gene PARK7 codifica a proteína DJ-1 ligase, proteína chaperona mitocondrial, aparente sensor de radicais livres de oxigênio (ROS) e previne agregação de  $\alpha$ -sinucleína (Yang & Lu, 2009).

A grande maioria das mutações são alterações mitocondriais, de sistemas ubiquitina-proteossoma ou proteínas com conformação atípica (Nagatsu & Sawada, 2005). Estas alterações podem ser correlacionadas à patofisiologia da doença de Parkinson no que se refere ao estresse oxidativo e ao acúmulo de proteínas/toxinas que geram a neuroinflamação. A ocorrência de alelos predisponentes em casos de doença de Parkinson não familiar pode ser o gatilho e a ligação entre os fatores genéticos e ambientais (Eriksen *et al.*, 2005).

Após a descoberta do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) por Calne e Langston em 1983, passou-se a considerar as influências ambientais como fator predisponente a doença de Parkinson, e mais tardiamente, as neurotoxinas ambientais foram reconhecidas como fator associado ao desenvolvimento da doença de Parkinson idiopática (Spires & Hannah, 2005; Chun *et al.*, 2001).

Já está evidenciada a correlação entre a exposição prolongada a herbicidas e inseticidas - como rotenona, paraquat e organoclorados - e o desenvolvimento da doença de Parkinson (van der Mark *et al.*, 2012). Estudos epidemiológicos tem enfaticamente apontado o trabalho em lavoura e o tempo de exposição a pesticidas como fator de risco para doença de Parkinson (Dick *et al.*, 2007; Abbott *et al.*, 2003), com aumento da incidência nos países onde o controle destas substâncias é deficiente (Dorsey *et al.*, 2007). A exposição a metais como Alumínio, Ferro e Manganês também tem sido discutida como fator predisponente à doença, uma vez que não são degradados no ambiente e podem se acumular no cérebro e em outros tecidos em taxa maior que a de excreção do organismo (Prediger *et al.*, 2012).

A exposição a neurotoxinas ambientais tem dimensões temporal e espacial. Com relação à primeira dimensão, há que se considerar o aumento da expectativa de vida

e também do tempo de trabalho da população mundial e consequente aumento do tempo de exposição a toxinas ambientais. Já na segunda dimensão, atenta-se para a exposição a toxinas ambientais no local de trabalho, já bem conhecida e prevenida, e no meio ambiente de forma geral. Sabe-se que as toxinas geradas no local de trabalho não estão confinadas a ele, pois partículas produzidas no processo da industrialização e urbanização são emitidas no ar se espalham rapidamente no ambiente, podendo alcançar distâncias consideráveis. Sendo assim exposição a baixos níveis de toxinas de forma contínua e prolongada pode ter um efeito neurotóxico cumulativo gerando neurodegeneração de longa latência (Lucchini & Zimmerman, 2009).

A interferência da dieta no desenvolvimento da doença de Parkinson é controversa. Evidências indicam que a ingestão de flavonóides (Gao *et al.*, 2012), dieta rica em vegetais, legumes, cogumelos, frutas, algas, peixes (Okubo *et al.*, 2012) e consumo de cafeína (Liu *et al.*, 2012) estão correlacionados ao decréscimo na predisposição a doença de Parkinson. Já a elevação da predisposição está associada ao consumo de carboidratos e gorduras polinsaturadas (Abbott *et al.*, 2003), a obesidade, uma vez que ambas estão relacionadas à diminuição de receptores de dopamina no sistema nigroestriatal em humanos (Wang *et al.*, 2011) e aumento da vulnerabilidade a neurotoxinas por redução dos níveis de dopamina e tirosina hidroxilase no estriado (Sriram *et al.*, 2002).

### **1.5 Manifestações clínicas da Doença de Parkinson**

O quadro clínico da doença de Parkinson é caracterizado por alterações motoras e não motoras, sendo que o seu diagnóstico ainda é essencialmente sintomatológico, mas, definitivamente, este se faz apenas por exame *post-mortem* pela constatação de morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc e presença dos corpos de Lewy (Eriksen *et al.*, 2005). Os principais sinais motores da doença de Parkinson, tidos como cardinais, são quatro: bradicinesia, instabilidade postural, tremor de repouso e rigidez muscular (Jankovic, 2008).

Dentre os sintomas motores, a bradicinesia é o mais típico dos distúrbios de movimento, atingindo 80% dos parkinsonianos (Jankovic, 2008). É um fenômeno

complexo caracterizado pela diminuição da velocidade do movimento voluntário e implica na dificuldade de realizar tarefas sequenciais, repetitivas e simultâneas (Morris & Iansek, 1997). A instabilidade postural resulta da perda dos reflexos posturais (Jankovic, 2008) e, conseqüentemente, da perda da habilidade em manter o centro de massa corporal sobre a base de suporte durante atividades que envolvam transferências de peso ou reação a perturbações externas (Adkin *et al.*, 2003). A instabilidade postural é a causa mais comum de quedas, atrelada a outros sintomas da doença de Parkinson como hipotensão ortostática, alterações sensoriais de integração visual, vestibular e proprioceptiva (Marchese *et al.*, 2003) e contribui significativamente para o aumento da morbimortalidade dos pacientes (Martinolli *et al.*, 2011). O tremor de repouso é o primeiro sintoma aparente e o que diferencia a fase inicial da doença de Parkinson de outras síndromes extrapiramidais. Normalmente é unilateral, atingindo principalmente extremidades e desaparece durante o movimento intencional e sono (Benninger *et al.*, 2009; Jankovic, 2008). A rigidez muscular é definida como o aumento da resistência muscular à amplitude de movimento passivo de uma articulação (Bartolic *et al.*, 2005).

As alterações de locomoção, sinais primários da doença de Parkinson (King & Horak, 2009; Kwakkel *et al.*, 2007), são agravadas pelo envelhecimento, imobilidade e desuso muscular (Giladi, 2009). A locomoção é afetada por alterações músculo esquelética como fraqueza, perda de massa muscular e óssea, diminuição da flexibilidade muscular e amplitude de movimento articular, podendo chegar à instalação de deformidades, bem como deficiências cardiopulmonares (Yu *et al.*, 2006).

A doença de Parkinson está associada a um espectro mais amplo de manifestações clínicas para além dos distúrbios motores (Marras & Lang, 2008). Esses sintomas incluem distúrbios de sono, alterações gastrointestinais como constipação (Gao *et al.*, 2011), alterações autonômicas tais como hipotensão ortostática, e alterações sensoriais, cognitivas e psiquiátricas (Shi *et al.*, 2010; Marras & Lang, 2008). As alterações olfatórias – geradas pela degeneração no bulbo e no núcleo olfatório anterior - parecem ser o primeiro sintoma não motor evidente (Braak *et al.*, 2003).

A presença desses sintomas não motores indica acometimento de regiões cerebrais distintas da SNpc e suas projeções. As alterações intranigrais são sempre acompanhadas de degeneração em regiões como núcleos dos nervos vago e glossofaríngeo, zona reticular intermediária, núcleos da rafe, complexo ceruleus-subceruleus, diversos núcleos do tálamo, amígdala, bulbo olfatório e neocórtex (Braak & Braak, 2000; Braak *et al.*, 2003).

Admite-se que as alterações que levam aos sintomas motores assim como aos não motores não ocorrem aleatoriamente, mas seguem uma sequência topográfica pré-determinada, possibilitando o estadiamento da doença de Parkinson em seis fases. Os estágios 1 e 2 caracterizam-se por alterações olfatórias, disfunções regulatórias autonômicas e acometimento de estruturas baixas do mesencéfalo. Os estágios 3 e 4 abrangem alterações motoras propriamente ditas e degeneração dos núcleos da base. Por sua vez, nos estágios 5 e 6 há declínio das faculdades intelectuais, memória e cognição com comprometimento do lobo temporal, estruturas límbicas, regiões associativas e lóbulo pré-frontal (Braak *et al.*, 2003). A hipótese de disseminação ao longo de regiões cerebrais traz consigo a ideia do início da doença ser pontual e local, não aleatória. Os sintomas não motores parecem preceder os motores e podem caracterizar estágios pré-clínicos desta doença. Por isso, são clinicamente importantes e oferecem possibilidades de rastreamento da evolução da doença. Assim, os fatores de risco desencadeadores da doença de Parkinson podem ser comuns, previsíveis e passíveis de identificação com biomarcadores (Hardy, 2010).

## **1.6 Alterações histopatológicas e moleculares na doença de Parkinson**

Classicamente, são reconhecidas como características histopatológicas da doença de Parkinson a destruição dos neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal, em especial a camada ventrolateral da SNpc (Calne, 2005) e a área tegumentar ventral (ATV) do mesencéfalo (Jackson-Lewis *et al.*, 1995), a presença de agregados fibrilares proteicos denominados corpos de Lewy (Wakabayashi *et al.*, 2012) e glia reativa (Gao & Hong, 2008). Sabe-se que os sintomas motores surgem quando há perda de 60-70% das células dopaminérgicas tirosina hidroxilase-positivas da SNpc (Przedborski *et al.*, 2000) e cerca de 80% das estriatais (Riederer

& Wuketich, 1976). A morte do neurônio dopaminérgico em doença de Parkinson se dá por disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, excitotoxicidade glutamatérgica por desinibição do núcleo subtalâmico, apoptose, anormalidade na degradação de proteínas seja pelo sistema proteossoma ou chaperona (Obeso *et al.*, 2010). Atualmente, alguns autores propõem que as alterações histopatológicas podem iniciar-se 20 anos antes dos sintomas motores; a fase pré-clínica, desse modo, poderia abranger alterações autonômicas ou psiquiátricas (revisão em Savica *et al.*, 2010).

### **1.6.1 Células da Glia e Doença de Parkinson**

Glia é o termo que designa o grupamento de células não neuronais residentes no SNC. É constituída de três tipos celulares principais: o astrócito, a micróglia e o oligodendrócito (Jessen, 2004). Como não existem evidências claras da participação de oligodendrócitos na doença de Parkinson (McGeer & McGeer, 2008), serão abordados os astrócitos e a micróglia.

Os astrócitos são o tipo celular mais numeroso do SNC (Gao *et al.*, 2008) podendo representar até 90% da massa cerebral (Gee & Keller, 2005). Os astrócitos desempenham diversas funções no SNC, como suporte físico e nutricional ao neurônio, tamponamento do espaço extracelular contra excesso de  $K^+$  e de neurotransmissores, secreção de fatores neurotróficos, formação da barreira hematoencefálica (BHE), regulação imune intrínseca (Gao *et al.*, 2008; Gee & Keller, 2005) e modulação da atividade neuronal (Hinkerohe *et al.*, 2005). Os astrócitos fibrosos possuem um formato estrelado com prolongamentos extensos e delgados que termina em sua maioria em contato com o endotélio vascular, formando os pés vasculares. Este contato astrócito-endotélio integra a unidade morfofuncional da BHE, o complexo gliovascular que protege o SNC de perturbações periféricas (Jessen, 2004) e atribui às células residentes não neuronais o papel imune, uma vez que em condições normais a BHE não permite a passagem de células imunes periféricas. O astrócito parece atuar como célula apresentadora de antígeno, pois já foi evidenciada a expressão de MHC II e moléculas de adesão como a de adesão intercelular (ICAM) (Gee & Keller, 2005).

Em situação de neuroinflamação, os astrócitos tornam-se ativados e alteram sua morfologia. Essas células podem se reorganizar em torno do sítio da lesão formando uma espécie de barreira para regeneração, culminando na formação de cicatriz glial (Jessen, 2004) e produzem diversas citocinas pró-inflamatórias com destaque para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Barcia *et al.*, 2011). A permeabilidade da BHE pode ser alterada nessa condição, pois o astrócito agindo sobre o endotélio permite a passagem de células T circulantes para o parênquima cerebral (Gee & Keller, 2005). Os astrócitos também secretam diversas substâncias que contribuem para sustentar a neuroinflamação como metaloproteases (MMP) e óxido nítrico (NO) (Jessen, 2004), bem como para sua resolução ao secretar fatores neurotróficos - o de crescimento de fibroblasto, o de crescimento neural (NGF), neurotrofina -3 (NT-3) (Gee & Keller, 2005).

A micróglia são células de origem mesodérmica e monocítica, de natureza reativa e capacidade fagocitária que estão distribuídas por todo cérebro, representando 10% das células da glia, (McGeer & McGeer, 2004). Quando ocorre algum processo de injúria, essas células são ativadas alterando suas características, migrando, fagocitando e agregando-se em torno do sítio da lesão (McGeer & McGeer, 2008). A neuroinflamação transitória é uma resposta natural e consequente à injúria ou infecção, visando à preservação e viabilidade do tecido cerebral (Wyss-Coray & Mucke, 2002; Tansey *et al.*, 2007).

O estado da micróglia varia de repouso a hiperativação e está sob controle estrito de diversas proteínas regulatórias (Michelucci *et al.*, 2009). A ativação clássica seria iniciada por TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  - que poderiam ser os fatores chave para tal ativação (He *et al.*, 2002; Mosser, 2003) -, e por agregação de  $\alpha$ -sinucleína, o mais potente ativador da micróglia conhecido (Klegeris *et al.*, 2008; Zang *et al.*, 2005). Ativação alternativa poderia ser iniciada pela administração de interleucina-4 (IL-4), glicocorticóides, NO (Le *et al.*, 2001; Jenner, 2003; Ryu, 2002) ou por produtos da cascata clássica do complemento (McGeer & McGeer, 2008). A ativação da micróglia resulta em aumento do fluxo sanguíneo ao redor do tecido lesado, transportando mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas (Anrather *et al.*, 2006), ROS (Koutsilieris *et al.*, 2002; Jenner, 2003), fatores pró-apoptóticos e MMP (Mosser, 2003). Em estado hiperativo há elevação significativa da expressão de moléculas de ativação/adesão na superfície celular da

micróglia (Gao & Hong, 2008) com CD45, MHC I e II, aumento da síntese e liberação de fatores pró-inflamatórios e pró-oxidantes, (Anrather *et al.*, 2006) que levariam a danos e morte dos neurônios dopaminérgicos adjacentes (Gao *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003), e isto torna a micróglia um tipo de população mononuclear fagocitária bastante atípica com gradações de ativação (Perry *et al.*, 2007).

A micróglia também apresenta ativação anti-inflamatória e ação neuroprotetora (Mosser, 2003). Para isso, secreta quimiocinas que atraem leucócitos, citocinas anti-inflamatórias, e alguns componentes de matriz extracelular que promovem a proliferação celular, angiogênese e reconstrução da própria matriz, consequentemente o reparo da injúria (Mosser, 2003). Secreta também fatores de neurotróficos como NGF, NT-3 e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Baquet *et al.*, 2005; Peterson & Nutt, 2008).

### **1.6.2 Unidade neurovascular e barreira hematoencefálica**

A BHE é uma interface seletiva e dinâmica de multicomponentes que intermedia ou restringe o acesso de outros constituintes do organismo e do ambiente que trafegam pelo sistema circulatório ao líquido e ao SNC. Sua função é manter a homeostase do SNC e estabelecer um ambiente constante e favorável à fisiologia intracerebral, respondendo tanto aos sinais circulatórios quanto aos do parênquima cerebral, fazendo, assim, um *cross-talk* entre o SNC e o sistema circulatório. A BHE é composta pelas unidades neurovasculares formadas por células endoteliais da cerebrovasculatura e sua membrana basal, pericitos e astrócitos adjuvados por micróglia e neurônios (Grammas *et al.*, 2011; Carvey *et al.*, 2009 e 2005).

Regiões cerebrais periventriculares – eminência hipotalâmica medial, hipófise, plexo coriódio, área postrema e bulbo olfatório - possuem BHE menos restritiva. Nestas áreas os capilares são fenestrados, com poros circulares de 40-60 nm cobertos por finos diafragmas de membrana plasmática, células endoteliais com pequena quantidade de junções e de baixa atividade pinocítica. Funcionalmente, estas regiões necessitam ser integrados e suas secreções distribuídos rapidamente a todo organismo, justificando a permissividade da BHE. Esta representa,

aproximadamente, 1% da área da BHE e pode constituir uma região vulnerável as toxinas ambientais (Carvey *et al.*, 2009).

Em situação de desestabilização da BHE, ocorre edema perivascular, desprendimento dos pés vasculares dos astrócitos e alteração da conformação das células endoteliais, bem como alteração na sinalização célula-célula. Alterações nas funções da BHE ocorrem por inflamação sistêmica ou cerebral e em resposta ao estresse térmico, neuroquímico e emocional, estão implicadas no desenvolvimento e instalação de diversas doenças no SNC, inclusive doença de Parkinson com a morte de neurônios dopaminérgicos.

Em indivíduos parkinsonianos, os capilares têm sua forma alterada e perdem o contato normal com o neurônio (Grammas *et al.*, 2011). Kortekaas *et al.* (2005) foram os primeiros a observar quebra na BHE em doença de Parkinson. Através de tomografia, observaram acúmulo de um medicamento não permeável a BHE nas áreas dopaminérgicas de pacientes parkinsonianos, indicando a forte correlação da disfunção da BHE com a etiologia e/ou o agravamento do quadro doença de Parkinson e corroborando com a hipótese do desencadeamento da doença a partir de insultos ambientais. Já foi demonstrada a desestabilização da BHE em modelos experimentais de doença de Parkinson induzido por MPTP intraperitoneal em camundongos (Chen *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2007) e por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) intranigral em ratos (Carvey *et al.*, 2005). É sabido que, em camundongos, o tratamento com MPTP desestabiliza a BHE, gera neuroinflamação que contribui para o aumento da permeabilidade endotelial, aumenta a expressão da MMP-9 diminui os níveis das proteínas das junções ocludentes (Chen *et al.*, 2008).

O avançar da idade também parece alterar a estabilidade da BHE. Em modelos experimentais, foi visto diminuição do número de junções ocludentes, maior propensão ao dano e lentidão na recuperação da BHE (Carvey *et al.*, 2009). É importante salientar que existe uma miríade de estados funcionais para BHE e não apenas o dicotômico íntegro e rompido (Carvey *et al.*, 2009).

### 1.6.3 Neurodegeneração e Neuroinflamação na Doença de Parkinson

Doenças neurodegenerativas caracterizam-se pelo processo crônico e progressivo de perda neuronal em áreas do SNC com consequentes déficits em funções cerebrais. O mecanismo subjacente à neurodegeneração ainda não está esclarecido, mas discute-se, de modo crescente, a participação da neuroinflamação incontrolada (Teismann *et al.*, 2003), incluindo-se a microgliose como característica histopatológica importante (Gao & Hong, 2008).

O cérebro pode desencadear e sustentar uma resposta imune inata que resultaria em dano as células locais (McGeer & McGeer, 2004). Ocorrem interações de neurônios lesados e micróglia ativada num ciclo que se auto propaga, causando inflamação incontrolada e prolongada que forçaria a progressão tanto da doença de Parkinson quanto de outras condições neurodegenerativas (Chen *et al.*, 2008). A questão crucial é como a lesão neuronal ocorre e como é transformada em neuroinflamação sustentada, transpondo o limiar de tolerância do SNC. A intensidade do insulto, o tempo de persistência, a vulnerabilidade individual, a co-ocorrência de situações agravantes afetam a reação do sistema imune no SNC (Gao & Hong, 2008).

Em relação à doença de Parkinson, Mogi *et al.* (1994), em estudo *post-mortem*, mostraram níveis elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6, Fator de Crescimento Transformante alfa (TGF- $\alpha$ ), e Fator de Crescimento Epidérmico no estriado de indivíduos com doença de Parkinson quando comparados a pacientes não parkinsonianos. Também, Mogi *et al.* (2000, 1996a e 1996b) mostraram aumento da expressão de caspases 1 e 3, receptor p55 de TNF- $\alpha$ , Fas e Bcl-2 somente na SN de parkinsonianos. Os níveis de algumas citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4) e de TGF- $\alpha$  são mais elevados no líquido isolado de ventrículo cerebral de pacientes com doença de Parkinson juvenil, enquanto, IL-2 e IL-6 estão mais elevados no líquido de pacientes com doença de Parkinson esporádica (Mogi *et al.*, 1996c). Brodacki *et al.* (2008) detectaram elevados níveis circulantes de IL-2, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em pacientes com doença de Parkinson. Scalzo *et al.* (2009 e 2010) mostraram níveis séricos elevados de TNF- $\alpha$  e IL-6 em pacientes com doença de Parkinson.

Em modelo animal de parkinsonismo, Barcia *et al.* (2011) mostraram, em macacos e camundongos, que o IFN- $\gamma$  tem papel crucial na ativação da micróglia da SNpc, em

período que precede a morte neuronal. Esta citocina pode agir sobre a própria micróglia, onde é produzida, ou sobre astrócitos, sendo responsável pelas alterações morfológicas que caracterizam o estado ativado destas células. IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que parece agir sobre a glia secundariamente, atuam sinergicamente na ativação da glia, bem como na perpetuação deste estado hiperativo durante anos. Os níveis séricos dessas duas citocinas são mantidos elevados durante todo o curso da manifestação da doença de Parkinson em macacos, em comparação com os de outras citocinas.

Esse processo neuroinflamatório estaria associado à produção de outras substâncias neurotóxicas como ROS e espécies reativas de nitrogênio, resultantes de disfunção mitocondrial, principalmente dos complexos I e III da membrana interna (Smeyne & Jakson-Lewis, 2005; Teismann *et al.*, 2003; Giasson *et al.*, 2000). A disfunção mitocondrial é percebida, em estudos *post-mortem* de pacientes com doença de Parkinson, pela depleção de ATP e alteração da NADPH (fosfato de nicotidamida dinucleotídeo reduzido) na SN e estriado (Nagatsu & Sawada, 2005). Essa enzima é alvo comum em modelos químicos de parkinsonismo (McGeer & McGeer, 2004). A depleção de ATP celular aumenta a geração de ROS, altera as concentrações de  $\text{Ca}^{+2}$  e leva a fissão da mitocôndria, consequente liberação de citocromo C, ativação de caspases e translocação nuclear de Bax (Chan *et al.*, 2010). O estresse oxidativo pode ser exacerbado pela crescente disfunção mitocondrial, gerando radicais livres e ativando a micróglia observada em casos de doença de Parkinson idiopática (Chun, 2001).

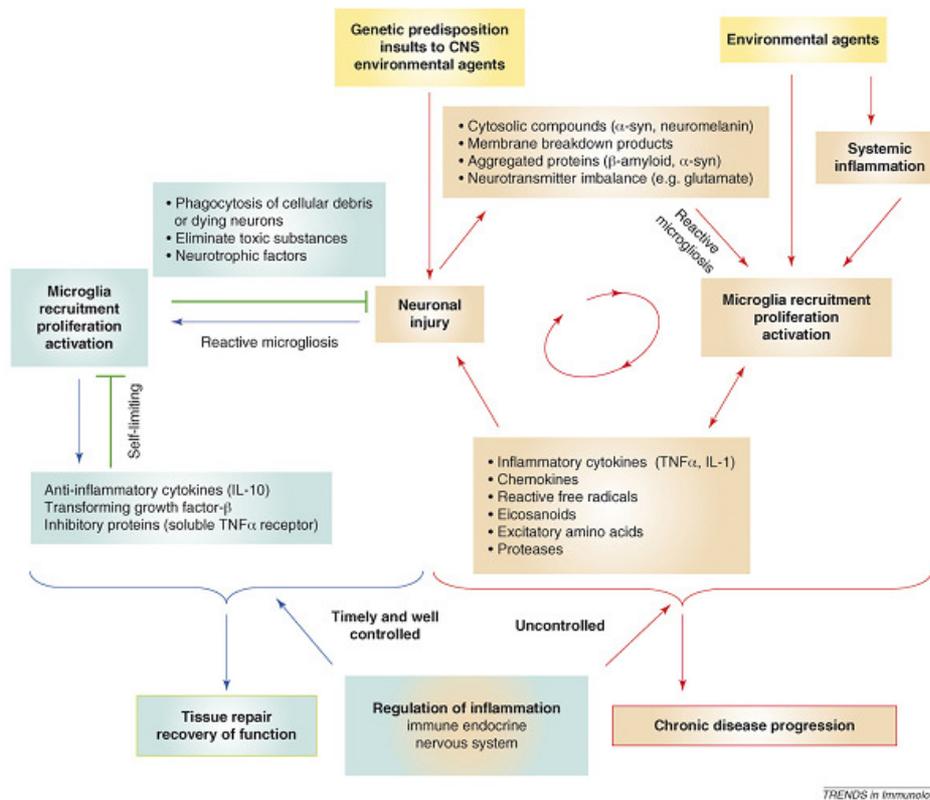
Além disso, existe a formação de proteínas anormalmente estruturadas, principalmente  $\alpha$ -sinucleína, e disfunção no sistema ubiquitina-proteossoma (Jenner, 2003). Todas estas alterações com falência da compensação devida desencadeiam a apoptose no estriado de indivíduos doença de Parkinson (Nagatsu & Sawada, 2005).

Tradicionalmente, o SNC é considerado imunologicamente privilegiado por sua capacidade inflamatória limitada, pequena infiltração de vasos linfáticos e presença da BHE. Logo, uma reação imune local no SNC não envolveria células do sistema imune periférico e somente células residentes - que seriam responsáveis pela produção de citocinas inflamatórias e modificação para perfil fagocítico (McGeer &

McGeer, 2004). Atualmente, o SNC é considerado imunologicamente especializado (Gao & Hong, 2008), pois há relatos da participação de linfócitos periféricos em insultos crônicos do SNC, indicando um *cross-talk* entre resposta imune inata e adaptativa em condições neurodegenerativas (Nitsch *et al.*, 2004). Esta relação pode ser evidenciada pela mudança de fenótipo da micróglia desencadeada pela inflamação sistêmica com seus fatores carregados pela circulação e/ ou interagindo diretamente com as células endoteliais da BHE (Perry *et al.*, 2007).

Percebe-se que o microambiente no SNC principalmente na SN se modifica durante o processo patológico da doença de Parkinson. E estas alterações não envolvem apenas as células da glia, mas também as células imunes periféricas e células endoteliais (Hirsch *et al.*, 2005).

A Figura 2 sintetiza os possíveis fatores intrínsecos e extrínsecos envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença de Parkinson.



**Figura 2:** Possíveis interrelações dos fatores envolvidos no desenvolvimento/progressão da Doença de Parkinson (retirado de Gao & Hong, 2008).

## 1.7 Modelos experimentais de doença de Parkinson

Existem diversos modelos experimentais de parkinsonismo, dentre eles os modelos de indução por fármacos, os modelos baseados nas características histopatológicas da doença de Parkinson, os modelos genéticos em organismos multicelulares e modelos induzidos por pesticidas e por neurotoxinas.

Dentre os modelos de indução por fármacos destaca-se a reserpina. Este modelo é utilizado majoritariamente para investigação de tratamentos farmacológicos. Tem por vantagens a semelhança bioquímica com a doença de Parkinson e a geração de acinesia e rigidez. Entretanto, apresenta a desvantagem de inibir o transportador vesicular de monoamina, causando depleção de outras aminas além da dopamina. Ademais, não gera morte dopaminérgica nigral e deve ser administrada por via intracerebral (Duty & Jenner, 2011). O modelo de administração intranigral de LPS – lipopolisacarídeo - reproduz os eventos inflamatórios relacionados à doença de Parkinson e leva à morte neuronal dopaminérgica por estresse nitrativo e citocinas pró-inflamatórias. A desvantagem é a administração intracerebral e o desenvolvimento sintomático unilateral. Os modelos genéticos ainda são um desafio. Em camundongos, *Drosophila megalomaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Dario rario* ainda não reproduzem a sintomatologia do parkinsonismo e de fato contribuem mais para as discussões sobre a patogênese da doença de Parkinson (Duty & Jenner, 2011).

Já o modelo de neurotoxina mais amplamente utilizado é a administração intracerebral de 6-OHDA. Este modelo permite traçar estratégias terapêuticas e neuroprotetoras, além de possibilitar a observação das consequências da morte neuronal dopaminérgica em curto período de tempo. Apresenta perfil bioquímico, neuroinflamatório e morte neuronal nigroestriatal por estresse oxidativo e disfunção mitocondrial semelhante à doença de Parkinson. As desvantagens deste modelo são a lesão restrita à área de injeção da droga, não formação de corpos de Lewy e a administração intracerebral ser unilateral – a administração bilateral gera disfagia e dificulta a manutenção do animal. Assim, apesar do fenótipo robusto, o acometimento motor é unilateral e, portanto, não se assemelha a sintomatologia da doença de Parkinson.

Os modelos induzidos por pesticidas apresentam duas drogas em destaque rotenona e paraquat. A rotenona é altamente lipofílica, favorecendo administrações sistêmicas, gera morte neuronal dopaminérgica por estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inibição proteossômica além de provocar intenso perfil inflamatório. Também favorece a formação de corpos de Lewy, diminui atividade locomotora e responde favoravelmente a diferentes fármacos utilizados no tratamento de parkinsonismo, sendo melhor enquadrada na definição de modelo para neuroproteção. Em contrapartida, tem alta toxicidade sistêmica solicitando administrações repetidas em baixas doses e necessita de um grande número de animais devido ao grande percentual que pode ser resistente à ação da rotenona. Já o paraquat gera perfil inflamatório leve, morte de neurônios dopaminérgicos por estresse oxidativo e alterações comportamentais sem grande alteração do conteúdo estriatal de dopamina. Além disso, está associado à elevada taxa de mortalidade em roedores por disfunção respiratória e perda de peso (Bové & Perier, 2012).

### **1.7.1 Modelo experimental de doença de Parkinson por administração de 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina hidrocloreto – MPTP**

O 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina hidrocloreto (MPTP) é análogo de meperidina, um subproduto da síntese química da heroína, com potentes efeitos similares aos dessa droga (Langston *et al.*, 1999). Relatos da neurotoxicidade deste composto e sua utilização como ferramenta de pesquisa tornou-se predominante no início da década de 1980, após a identificação de usuários de heroína no norte da Califórnia que apresentavam-se nas salas de emergência com sintomas semelhantes aos da doença de Parkinson (Langston, 1985). O MPTP é um dos raros casos em que a toxina foi descoberta em humanos e depois desenvolvida em modelo animal (Smeyne & Jackson-Lewis, 2005). O MPTP é um bom modelo de indução de parkinsonismo por produzir morte significativa e irreversível de neurônios dopaminérgicos, de forma seletiva e específica (Przedborski *et al.*, 2000), e por mimetizar os sintomas motores e alterações histopatológicas em humanos e outros primatas, gatos e roedores (Barcia *et al.*, 2011, Faherty *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2003; Chun *et al.*, 2001; Langston, 1985). A dessemelhança se dá pela ausência de formação de corpos de Lewy (Nagatsu *et al.*, 2002).

O MPTP atravessa livremente a BHE por ser altamente lipofílico (Nagatsu *et al.*, 2002; Chun *et al.*, 2001), é captado pelas células endoteliais e da glia, em especial astrócitos, por meio de transportadores de monoamina e glutamato (Hazell & Norenberg, 1997) e convertido a MPDP<sup>+</sup> (N-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridínio) pela enzima monoamina oxidase B - MAO-B (Przedborski *et al.*, 2000). Em seguida, é liberado no espaço extracelular, provavelmente se oxida espontaneamente e, desprotonado, torna-se a neurotoxina ativa, o MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridínio) (Nagatsu *et al.*, 2002). O MPP<sup>+</sup> diminui a recaptação de glutamato por astrócitos, neurotransmissor sabidamente neurotóxico (Hazell & Norenberg, 1997) e estimula o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (Teismann *et al.*, 2003), que por sua vez incita a produção de NO pela enzima óxido nítrico sintase induzível que é anormalmente superexpressa no cérebro de parkinsonianos (Hunot *et al.*, 1999). Uma vez no espaço extracelular, a neurotoxina é rapidamente capturada pelo DAT (Bezard *et al.*, 1999; Gainetdinov *et al.*, 1997) nos neurônios dopaminérgicos, com maior afinidade de captação pelas terminações nervosas da região nigroestriatal (Nagatsu *et al.* 2002; Del Zompo *et al.* 1993) e menor pela área tegumentar ventral (Jackson-Lewis *et al.*, 1995). No neurônio, pode seguir três vias distintas: ser carregado por transportadores de monoaminas e acumulado em vesículas citoplasmáticas (Del Zompo *et al.*, 1993), acumular-se ativamente nas mitocôndrias ou permanecer no citoplasma e interagir com as enzimas residentes (Przedborski *et al.*, 2000). Quando acumulado em vesículas dopaminérgicas, força a permanência da própria dopamina no citoplasma que pode se auto oxidar gerando ROS (Lotharius & O'Malley, 2000). Este sequestro vesicular pode ser considerado como um mecanismo protetor numa tentativa de diminuir os efeitos deletérios da neurotoxina (Smeyne & Jackson-Lewis, 2005).

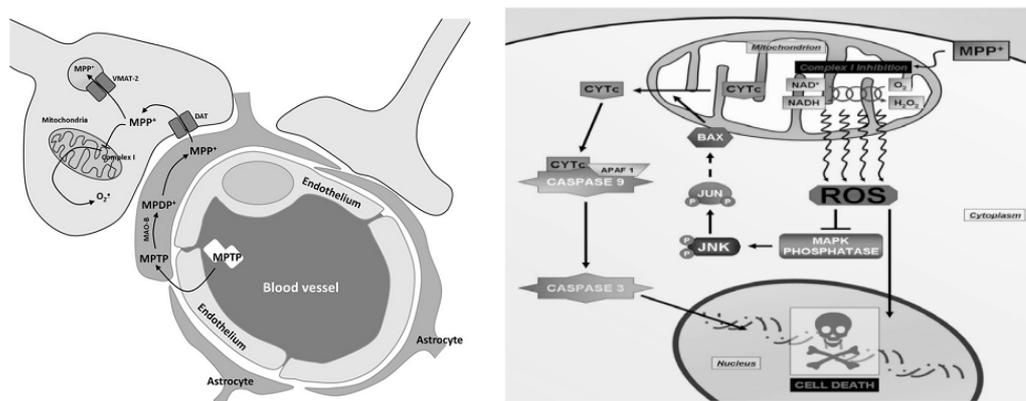
Na mitocôndria, o MPP<sup>+</sup> entra por difusão e pode se acumular em sua membrana interna bloqueando os complexos I - NADH: ubiquinona oxidoreductase - (Fonck & Baudry, 2003), III e IV - ubiquinol: ferrocitocromo C oxidoreductase e citocromo C oxidase - (Suzuki *et al.*, 1992) e, por conseguinte, inibindo a respiração celular e reduzindo os níveis de ATP. Esta perda de energia, entre outros efeitos, gera ROS, radicais hidroxila e NO que podem interagir e formar peroxinitrito (Przedborski & Vila 2003; Przedborski *et al.*, 2000; Ischiropoulos & Al-Mehdi, 1995) além de elevar os níveis intracelulares de Ca<sup>+2</sup> a níveis citotóxicos. A inibição do complexo I também

resulta na abertura dos poros de permeabilidade transitória da mitocôndria permitindo a passagem de citocromo C, importante indutor de apoptose (Nagatsu *et al.*, 2002). Esta elevação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode causar danos em proteínas e no DNA de neurônios dopaminérgicos (Przedborski *et al.*, 2000). Também, ativa a cascata de morte celular radicais livre dependente, caracterizando a fase tardia da toxicidade do MPTP, onde o aumento do ROS aumenta a expressão de Bax/Bcl-2 e ativa JNK 1/2 MAP quinase, que fosforila fatores de transcrição como c-Jun (componente do fator de apoptose-1), p53 e NF- $\kappa$ b, que ativam caspase-1, 3 e 8, que por sua vez clivam Ciclina dependente de quinase 11 levando a apoptose (Przedborski *et al.*, 2004b; Chun *et al.*, 2001). O mecanismo patogênico do MPTP envolve interação entre os neurônios e o microambiente não-neuronal (Smeyne & Jackson-Lewis, 2005) e parece ser um ciclo de disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, falência energética e excitotoxicidade (Chun *et al.*, 2001; Przedborski *et al.*, 2000).

Por via intraperitoneal, o MPTP inicia a neurodegeneração na SNpc 12 horas após sua administração, com pico de morte neuronal entre 24 e 48 horas e atinge platô 4 dias pós intervenção (Jackson-Lewis *et al.*, 1995). Por via intranasal, foi visto que o MPTP inicia ativação no bulbo olfatório de JNK quinase 30 minutos após a administração, leva a ativação de caspase 3 (Prediger *et al.*, 2009) e há inibição do complexo I mitocondrial estriatal 6 horas após a infusão (Moreira *et al.*, 2010), e este processo se perpetua por, pelo menos, 20 dias (Prediger *et al.*, 2010 e 2009). *In vitro*, a degeneração dopaminérgica é detectada nas primeiras 24 horas do tratamento com MPTP e, neste período, não há ativação evidente da micróglia, indicando que a morte neuronal precede a ativação desta célula. Isto é corroborado pelo fato da indução de citocinas na micróglia só ocorrer em resposta à morte neuronal (Gao *et al.*, 2003).

Os neurônios dopaminérgicos da SNpc parecem ser particularmente vulneráveis a ação do estresse oxidativo extracelular de origem microglial, uma vez que este gera lesões subletais em outros grupamentos celulares desta região sendo letal apenas para os neurônios dopaminérgicos, aparentemente, já comprometidos de alguma maneira (Wu *et al.*, 2002). Vulnerabilidade diferencial ao MPTP pode ser correlacionada aos níveis de expressão de DAT (Bezard *et al.*, 1999).

Atualmente existem diversos modelos experimentais de indução de parkinsonismo, porém carece-se de um modelo que mimetize a progressão da doença em seus sintomas, suas alterações celulares e sua resposta à medicação. O modelo de infusão intranasal de MPTP se torna interessante por utilizar administração única da droga, gerar lesões em regiões semelhantes à doença de Parkinson em humanos, por satisfazer a esses critérios de evolução ao apresentar acometimento gradual das estruturas cerebrais, e por não se circunscrever à lesão exclusiva da SNpc. Além disso, a via olfatória é uma hipótese pertinente, haja vista as características anatômicas, histológicas e fisiológicas do epitélio olfatório, a fraca BHE onde se insere este nervo, a forte incidência de doença de Parkinson relacionada a agentes ambientais e a perda de identificação e discriminação olfatória como sintoma pré-clínico na doença de Parkinson, e também de outras doenças neurodegenerativas como Alzheimer (revisto em Fusari & Molina, 2009a e 2009b).



**Figura 3:** Ilustração esquemática da via de entrada do MPTP e possíveis mecanismos moleculares envolvidos na morte neuronal induzida por esta droga (retirado de Prediger *et al.*, 2012 e 2010).

## 1.8 Exercício Físico

O exercício físico é definido como atividade física planejada e estruturada cujo objetivo é melhorar um ou mais aspectos da aptidão física (ACSM, 2003). Em humanos é sabidamente um fator de proteção e diminuição/controlado de diferentes fatores de risco para uma gama de doenças cardiovasculares, osteomusculares, endócrinas, metabólicas e neurodegenerativas (ACSM, 2003). Diversos ensaios clínicos sugerem que o exercício físico é benéfico para a saúde física em geral e função cognitiva, principalmente em idades mais avançadas (Cotman & Bertchold,

2002). É observada correlação positiva entre condição cardiovascular exercício aeróbico dependente e volume encefálico (Colcombe *et al.*, 2003) bem como aumento do volume cerebral em áreas comumente acometidas pela senescência (Colcombe *et al.*, 2006).

Em indivíduos parkinsonianos, o exercício aeróbico é uma intervenção frequente em diversos estudos clínicos randomizados que demonstram melhora consistente na capacidade funcional do indivíduo parkinsoniano em múltiplos níveis, como funcionalidade, aptidão física, força, equilíbrio, velocidade de marcha (revisão em Goodwin *et al.*, 2008), atividades de vida diária, desempenho motor, iniciação de movimento, deambulação, funções executivas, cognição e qualidade de vida (Cruise *et al.*, 2011). Estudos epidemiológicos apontam que a manutenção de exercício moderado e vigoroso ao longo da vida esta associada à diminuição da propensão ao desenvolvimento de doença de Parkinson (Chen *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2002). A manutenção de exercício físico no colégio, universidade e na idade entre 30 e 40 anos diminui o risco de desenvolvimento de doença de Parkinson em homens (Chen *et al.*, 2005). O exercício físico é um fator neuroprotetor para outras condições neurodegenerativas como demência e Alzheimer em indivíduos idosos (Laurin *et al.*, 2001). Tillerson e colaboradores (2002) discutem a hipótese de que o decréscimo da atividade física no paciente parkinsoniano não seja apenas um sintoma, mas também um fator que pode agravar a neurodegeneração.

O exercício físico em esteira tem sido incluído nos programas de tratamento de indivíduos doença de Parkinson tradicionais para aumentar sua carga aeróbica. Já está descrito na literatura que exercício em esteira melhora o desempenho motor e em atividades de vida diária (Miyai *et al.*, 2000), melhora a capacidade de deambulação (Skidmore *et al.*, 2008 a e b), por aumentar a velocidade de marcha e o comprimento do passo (Fisher *et al.*, 2008), diminui a bradicinesia, por melhorar a condição muscular e os padrões de movimento (Bergen *et al.*, 2002), diminui a fadiga e melhora a qualidade de vida dos parkinsonianos (Canning *et al.*, 2012).

Em modelos animais de parkinsonismo, já está descrito que o exercício físico em esteira afeta o estriado elevando seus níveis de GDNF e BDNF (Tajiri *et al.*, 2010), diminuindo a expressão de DAT (Petzinger *et al.*, 2007) - o que diminui a concentração citoplasmática de dopamina e previne assim sua oxidação (Chen *et al.*, 2005) -, e aumenta o número de receptores D2 (Vuckovick *et al.*, 2010). Também

pode gerar alterações adaptativas nos núcleos da base e modulatórias dos neurônios glutamatérgicos no estriado (Petzinger *et al.*, 2007).

Em animais lesados neuroquimicamente, pode ter efeito restaurador sobre a lesão de MPTP (Pothakos *et al.*, 2009) e 6-OHDA (Tajiri *et al.*, 2010) evidenciado pela melhora no comportamento motor e alteração da expressão de proteína glial fibrilar ácida estriatal (Dutra *et al.*, 2012). Este efeito neuroprotetor também ocorre na ATV em animais lesados por MPTP (Ahmad *et al.*, 2009). Também já foi demonstrado que roedores parkinsonianos em treinamento aeróbico em esteira desenvolvem tolerância ao exercício obtendo melhora de parâmetros físicos e adaptações dos sistemas autonômico, metabólico, muscular e cardiovascular com diminuição da frequência cardíaca de repouso, normalidade em eletrocardiograma, maior consumo de O<sub>2</sub>, hipertrofia de ventrículo esquerdo (Al-Jarrah *et al.*, 2007) aumento da densidade vascular cerebral (Al-Jarrah *et al.*, 2010) e melhora do equilíbrio e performance motora (Petzinger *et al.*, 2007).

Porém, o mecanismo que explica os efeitos do exercício físico nos neurônios dopaminérgicos não está completamente esclarecido (Al-Jarrah *et al.*, 2010). Alguns estudos correlacionam o efeito do exercício com o aumento dos níveis de agentes anti-inflamatórias circulantes ou fatores neurotróficos, melhora da oxigenação cerebral (Dishman *et al.*, 2006), melhora na função mitocondrial (Lau *et al.*, 2011) – atenuando a liberação de citocromo C - e elevação dos níveis de p53 (Patki & Lau, 2011).

Neste estudo optou-se pelo exercício forçado em esteira com inclinação de 5° com estimulação não nociva tendo em vista os argumentos acima apresentados e por permitir o controle de parâmetros como volume e intensidade de treinamento, e assim poder homogeneizar o grupo exercitado. Optou-se por utilizar uma inclinação de 5° na esteira para adequar o treinamento à biomecânica e cinemática do animal. Os roedores têm constituições musculares distintas nas patas posteriores e anteriores. As patas posteriores são constituídas para permitir propulsão e suporte de carga, e assim são mais longas que as anteriores, com musculatura robusta e postura fletida e estão conectadas ao tronco por fortes ligamentos fibromusculares, além de se localizarem próximas ao centro de gravidade do corpo do animal. Sendo assim, uma leve inclinação favorece a biomecânica da propulsão, a estabilidade -

por aproximar o centro de gravidade da base de suporte – e a cinemática do movimento de marcha (Shmidt, 2008; Couto *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2002). Também é sabido que há uma relação entre a inclinação do plano, a velocidade empregada, a carga de trabalho e o recrutamento muscular de membros posteriores (Hodson-Tole & Wakeling, 2010; Kaya *et al.*, 2003).

Segundo o *American College of Sports Medicine (ACSM)*, para gerar aptidão física em adultos saudáveis deve-se realizar exercício do tipo aeróbico por, no mínimo, 30 a 36 dias, com intensidade moderada a alta (64 a 73% da frequência cardíaca máxima ou 46 a 63% da captação máxima de oxigênio -  $VO_2\text{max}$ ) com duração de 30 a 60 min, frequência igual ou maior que 5 vezes por semana, gerando um volume de no mínimo 150 min/semana e 500 -1000 MET/semana (ACSM, 2003). Em modelos animais, os parâmetros do treinamento aeróbico em esteira variam grandemente. Foi observado melhora da aptidão física após 4 semanas de treinamento (Al-Jarrah *et al.*, 2007) e diversos estudos utilizaram este tempo total de intervenção (Dutra *et al.*, 2012; Tajiri *et al.*, 2010; Petzinger *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2004). A intensidade, traduzida em velocidade, varia de 11  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  (Tajiri *et al.*, 2010) a 23  $\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  (Fisher *et al.*, 2004). A frequência varia de 1 (Dutra *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2011; Tajiri *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2009; Pothakos *et al.*, 2009; Vuckovick *et al.*, 2010; Al-Jarrah *et al.*, 2007; Petzinger *et al.*, 2007) a 2 vezes por dia (Fisher *et al.*, 2004) distribuídos em 5 (Dutra *et al.*, 2012; Lau *et al.*, 2011; Tajiri *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2009; Pothakos *et al.*, 2009; Vuckovick *et al.*, 2010; Al-Jarrah *et al.*, 2007; Petzinger *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2004) há 7 dias por semana, com duração de 30 min (Tajiri *et al.*, 2010) a 60 min (Dutra *et al.*, 2012; Petzinger *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2004) E, majoritariamente, se inicia após lesão nigroestriatal, variando de 24 horas (Tajiri *et al.*, 2010) há 5 dias (Petzinger *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2004) pós-intervenção.

O exercício individualizado é recomendando por considerar a diversidade de condições físicas, fisiológicas e hábitos de vida presentes em uma população e assim sua diversidade de repostas ao exercício, além de prevenir lesões e sobrecarga dos sistemas musculoesquelético e cardiovascular (Haskell *et al.*, 2009).

O exercício aeróbico prévio já está evidenciado em estudos epidemiológicos como possível fator neuroprotetor para diversas doenças inclusive doença de Parkinson.

Em modelos animais, foi observado efeito benéfico do exercício prévio em condições cardiovasculares (revisto em Frasier *et al.*, 2011), acidente vascular encefálico (revisto em Dornbos & Ding, 2012; Zhang *et al.*, 2011), senescência de leucócitos circulantes (Werner *et al.*, 2009), depressão (Liu & Zhou, 2012) e diabetes tipo I (Hung *et al.*, 2008).

## 1.9 Fatores Neurotróficos

### 1.9.1 GDNF

O GDNF (*glial derived neurotrophic factor*) foi descoberto em 1993 por Lin e colaboradores em cultura de células B49 do mesencéfalo de ratos, como uma substância de baixa afinidade por astrócitos e alta afinidade por neurônios dopaminérgicos promovendo sua sobrevivência, ramificação e aumento do corpo celular, sendo, portanto considerado um fator neurotrófico dopaminérgico (Lin *et al.*, 1993). O GDNF é basicamente produzido por neurônios, mas em situação de injúria pode ser produzido por células gliais. Pertence a subfamília GFLs – *GDNF family ligands* (Lin *et al.*, 1993) integrada também pelos fatores Neurturin, Artemis e Persephin (Baloh *et al.*, 2000).

Os receptores específicos da subfamília GFLs são os co-receptores GFR $\alpha$  (*GDNF Family receptor  $\alpha$*  nas isoformas de 1-4) que se ligam ao RET (*REarranged during Transfection - receptor tyrosine kinase*) formando o complexo heterohexamérico GDLs-GFR $\alpha$ -RET (Parkash & Goldmann, 2009). Estes co-receptores estão ancorados a membrana celular por glicosil-fosfatidil-insitol agrupados ou não em *rafts* de membrana (Poteryaev *et al.*, 1999). O GDNF se liga especificamente a isoforma GFR $\alpha$ 1 e esporadicamente interage com as isoformas GFR $\alpha$ 2 e GFR $\alpha$ 3 (Airaksinen & Saarma, 2002). O GFLs interage com seu co-receptor, causando sua dimerização, isto ativa RET que se auto-fosforila e recruta proteínas de sinalização intracelular (Airaksinen *et al.*, 1999). Dependendo da localização do GFR $\alpha$  – dentro ou fora do *raft*, ocorrerá ativação em *cis* ou *trans* do RET, respectivamente. Em ativação *cis* o GFR $\alpha$  no *raft* está fracamente ligado ao RET. Quando o GFLs ativa o GFR $\alpha$  ocorre sua dimerização que recruta RET para os *rafts* de membrana, que também se dimerizam e se auto-fosforilam, levando a ativação da via Ras/MAPK.

(Paratcha *et al.*, 2001). Em ativação *trans*, o complexo GFR $\alpha$ -GFLs recruta o RET e pode leva-lo ou não a um *raft*. O RET se auto-fosforila e inicia a via de sinalização intracelular ativando as vias dependentes de PI3K e Akt. (Paratcha *et al.*, 2001). A sinalização dependente de RET pode ativar também a via de sinalização PLC (fosfolipase C) (Airaksinen & Saarma, 2002).

O GDNF afeta o desenvolvimento e sobrevivência de diferentes populações de neurônios. Sistemicamente, está expresso em neurônios simpáticos, parassimpáticos, entéricos, sensoriais somático e motoneurônios (Airaksinen & Saarma, 2002). No SNC está expresso principalmente em neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, no estriado principalmente na *spiny medium neurons* - que é o *input* dopaminérgico da SN (Oo *et al.*, 2009) -, núcleo accumbens, tálamo, córtex e hipocampo (Saavedra *et al.*, 2008). Apresenta baixos níveis de expressão em SN e ATV, porém a proteína é encontrada nestas áreas (Barroso-Chinea *et al.*, 2005).

Em neurônios dopaminérgicos, o GDNF é essencial para sua sobrevivência (Pascual *et al.*, 2008), promove hipertrofia e arborização dopaminérgica estriatal (Perez *et al.*, 2008; Hudson *et al.*, 1995), eleva os níveis de dopamina (Hebert *et al.*, 1996) promove a sobrevivência e novo crescimento de neurônios dopaminérgicos em cérebros adultos de ratos pós-MPTP (Hou *et al.*, 1996) e 6-OHDA (Tomic *et al.*, 1995). Pode regular a excitabilidade neuronal e liberação de dopamina, participando assim da sinaptogênese e plasticidade sináptica dopaminérgica (Bjerken *et al.*, 2007). Por sua vez, a dopamina pode regular a expressão do GDNF *in vitro* (Bozzi & Borelli, 1999) e *in vivo* (Guo *et al.*, 2002). Este efeito também pode ser visto pela ação de glutamato, serotonina e adenosina *in vitro* (Saavedra *et al.*, 2008). Outros fatores que podem estimular a produção de GDNF são o aumento do Ca<sup>+2</sup> intracelular, expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ . (Saavedra *et al.*, 2008).

Exercício físico aumenta a expressão de GDNF nigroestriatal e está relacionada com neuroproteção dopaminérgica e melhora da função motora em modelos indução de doença de Parkinson por MPTP (Faherty *et al.*, 2005; Tillerson *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2004) e 6-OHDA (Cohen *et al.*, 2003).

### 1.9.2 BDNF

O BDNF (*brain derived neurotrophic fator*) foi descoberto por Barde e colaboradores em 1982 que isolou de cérebro de porco um fator semelhante ao NGF, porém distinto funcional e imunologicamente, competente em manter neurônios sensoriais de galinha (Barde *et al.*, 1982). Pertence à família das neurotrofinas que conta com os membros NGF, NT-3 e NT-4/5 (McDonald & Chao, 1995). É sintetizada na forma precursora pré-pró-BDNF, clivada para forma pró-BDNF por enzimas citoplasmáticas e acumulado em vesículas densas, que podem ser liberadas por via regulada independente de  $Ca^{+2}$ , constitutiva em condições basais ou sofrer transporte retrógrado (Deutch & Roberts, 2008). O pró-BDNF pode ser secretado e tornar-se ativo no espaço extracelular pela ação de metaloproteases e plasminas ou permanecer como molécula precursora ativando o receptor p75 (Lu *et al.*, 2005). Pode atuar de forma autócrina ou parácrina (Howells *et al.*, 2000).

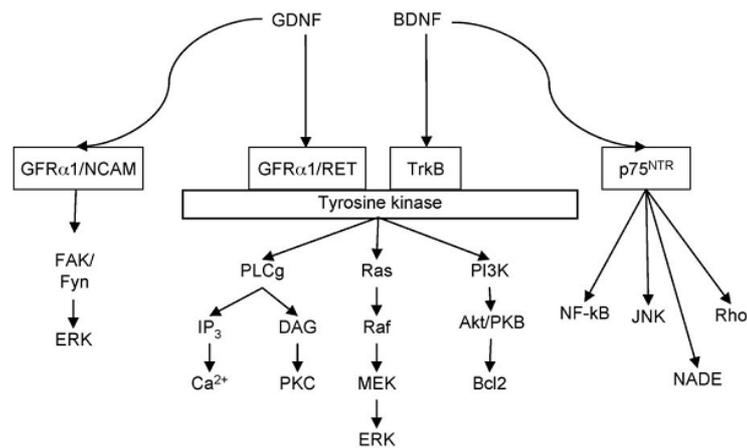
Os receptores da família das neurotrofinas são os homodímeros Trk (*Tropomyosine related quinase*) nas isoformas A-C pertencente à superfamília dos receptores tirosina-quinases. Os receptores TrkB são específicos para BDNF, podendo haver *cross-talk* deste receptor com NT-3 e NT-4/5. A forma madura da neurotrofina ativa a via de sinalização intracelular mediada por MAPK, PLC e PI3K. Quando a autofosforilação ocorre no resíduo tirosina 785 é recrutado e ativado PLC, que hidrolisa fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato em diacilglicerol e inositol-trifosfato ( $IP_3$ ). Diacilglicerol ativa proteína quinase C e  $IP_3$  é responsável pela liberação de  $Ca^{+2}$  dos estoques intracelulares (Reichardt, 2006). Este mecanismo pode estar envolvido na plasticidade sináptica (Yoshi & Constatine-Paton, 2008). Quando a fosforilação ocorre no resíduo tirosina 515 ou 490 onde há recrutamento de Shc que termina por recrutar Ras que por sua vez ativa MAPK/ERK1/2 e p38 ou transloca Akt e culmina com NF-kb, favorecendo membros da família Bcl-2 (Datta *et al.*, 1997; Aloyz *et al.*, 1998). PI3K pode ativar via independente de Ras através de Shc-Grb2 (*Src homologous and collagen-like protein* - Proteína 2 ligada a receptor de fator de crescimento) ou Isoflavina redutase (Reichardt, 2006). A primeira via parece regular a síntese de proteínas necessária à plasticidade sináptica, sustentar a arborização dendrítica, promover a sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento e manter suas funções de suporte durante a vida adulta (Kaplan *et al.*, 2000). A segunda via regula o tráfico de proteínas sinápticas (Reichardt, 2006). Ativação das vias de

sinalização desencadeada pela ligação do BDNF favorecem o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência neuronal.

Também existe o complexo receptor p75/sortilina pertencente à superfamília dos receptores TNF- $\alpha$ . É ativado inespecificamente por todas as neurotrofinas, tanto na forma madura quanto na forma precursora, e relacionado com inibição do crescimento axonal e mielinização por células de Schwann e oligodendrócitos, bem como morte celular programada. Quando ativado, inicia a cascata de sinalização Jun kinase (JNK) que resulta na indução da expressão de Fas ligante, ativação de p53 e consequente Bax. (Reichardt, 2006). A expressão de p75 está praticamente confinada a prosencéfalo colinérgico e restritas áreas corticais no cérebro adulto (Nagaraha *et al.*, 2011).

O BDNF está expresso em diversas regiões do SNC como medula, SN, amígdala, hipotálamo, cerebelo e hipocampo (Zhou *et al.* 2004) também músculo liso, neurônios sensoriais e retina (Hayman *et al.*, 1991). Em neurônios dopaminérgicos, o BDNF é responsável pelo desenvolvimento da SN e pela sobrevivência destes neurônios *in vitro* (Hyman *et al.*, 1999) e sua expressão está reduzida em neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal em pacientes parkinsonianos (Howells *et al.*, 2000). Em modelo animal, o tratamento com BDNF previne a perda de neurônios em lesões neuroquímicas com 6-OHDA (Levivier *et al.*, 1995) e MPTP (Frim *et al.*, 1994) e gera reinervação estriatal (Tsukahara *et al.*, 1995).

A elevação do BDNF é robusta e parece ter um papel crucial como mediador dos benefícios do exercício em longo prazo (Cotman & Bertchold, 2002). O exercício físico eleva a expressão de diversas moléculas associadas à ação do BDNF (Gomez-Pinilla *et al.*, 2002). A própria contração muscular ativa é capaz de modular os níveis de RNA mensageiro de BDNF no músculo e, por transporte retrógrado, nos motoneurônios na medula, indicando uma participação do BDNF na neuroplasticidade no sistema neuromuscular (Gomez-Pinilla *et al.*, 2002). Também foi visto melhora nos parâmetros motores em animais exercitados correlacionado ao aumento de BDNF (Lau *et al.*, 2011).



**Figura 4: Vias de sinalização de BDNF e GDNF.**

(retirado de Ghitza *et al.*, 2010).

Diante do que foi apresentado, as doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, constituem um desafio, pelo seu impacto social, sua sintomatologia progressiva e incapacitante e o tratamento paliativo. Torna-se relevante entender as correlações bioquímicas, estruturais e comportamentais em modelo experimental dessa doença. Não menos importante é a avaliação de intervenção capaz de prevenir o aparecimento ou atenuar a progressão da doença de Parkinson, como o treinamento físico prévio. Tal investigação pode contribuir para ampliação do conhecimento de agentes neurotóxicos e neuroprotetores e suas interrelações concernentes, mas não circunscritos, a doença de Parkinson.

## **2 OBJETIVOS**

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar se o treinamento aeróbico prévio à indução de parkinsonismo influencia parâmetros comportamentais, ultraestruturais e nos níveis de citocinas e fatores neurotróficos no sistema nigroestriatal de ratos submetidos à infusão intranasal de MPTP.

### **2.2 Objetivos específicos**

São nossos objetivos específicos, avaliar:

- i. os efeitos do treinamento aeróbico em esteira e infusão intranasal de MPTP sobre parâmetros comportamentais;
- ii. as alterações ultraestruturais em mesencéfalo ventral após administração intranasal do MPTP;
- iii. os níveis de GDNF, BDNF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 em mesencéfalo em resposta à infusão de MPTP e ao treinamento físico;

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Animais**

Utilizaram-se 72 ratos Holtzman machos fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG com idade de seis semanas e peso corporal inicial na faixa de 117-155 g. Em seguida, foram mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Morfologia/ICB-UFMG por todo período experimental. Onde permaneceram em gaiolas plásticas (41 x 31 x 16 cm), quatro animais por gaiola, no interior de estantes climatizadas (Alesco, Brasil), mantidas em temperatura de 21–23°C, com ciclos de iluminação de 12hs e com ração Nuvilab (Nuvital Nutrientes S/A, Brasil) e água e *ad libitum*. O manejo, uso e procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o protocolo 24/2011. Quando os animais atingiram a idade de 10 semanas, foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- i. Grupo EM: submetidos, sequencialmente, à: avaliação de desempenho aeróbico por esforço progressivo; treinamento físico em esteira; infusão intranasal de MPTP (n=18);
- ii. Grupo SM: submetido à infusão intranasal de MPTP (n=18);
- iii. Grupo ES: submetidos, sequencialmente, à: avaliação de desempenho aeróbico por esforço progressivo; treinamento físico em esteira submetido à infusão intranasal de salina (n=18);
- iv. Grupo SS: controle, submetido à infusão intranasal de salina (n=18).

#### **3.2 Aclimação à esteira e avaliação de desempenho aeróbico por esforço progressivo**

Nos dez dias que precederam o início do treinamento em esteira, os animais dos grupos EM e ES foram expostos à esteira durante cinco dias consecutivos, para aclimação ao ambiente. Utilizou-se esteira motorizada elétrica (Gaustec Magnetismo, Brasil) de 70 cm x 60 cm x 15 cm, em inclinação constante de 5° e com

cinco baias escuras. Cada baia está ligada a uma grade metálica que pode receber disparos elétricos de 0,8 Hz de frequência, de acordo com controle do operador.

Esse período de aclimação diária à esteira era dividido em duas etapas. Na primeira, os animais eram colocados, por 5 minutos, em baias individuais com a esteira parada e o estímulo elétrico ligado. Na segunda etapa, a velocidade da esteira era gradualmente aumentada de 0 até 10 m.min<sup>-1</sup> ao longo do sexto minuto, e esta velocidade era mantida até o décimo minuto, quando a esteira era desligada e os animais retornados às suas gaiolas.

Após o período de aclimação, os animais foram submetidos à avaliação de desempenho aeróbico por esforço progressivo durante três dias alternados. Essa avaliação foi realizada conforme preconizado pelo Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do ICB/UFMG (Balthazar *et al.*, 2009 e 2010; Leite *et al.*, 2009). No primeiro minuto da avaliação, a velocidade era aumentada progressivamente de 0 a 10 m.min<sup>-1</sup> e mantida até o final do terceiro minuto. A seguir, a velocidade era aumentada em 1 m.min<sup>-1</sup> a cada 3 min até que o animal apresentasse sinais de fadiga. Neste trabalho, considerou-se como fatigado o animal que permanecia por tempo superior a 10 segundos sobre o estímulo elétrico ou realizava três episódios de retorno ao gradil elétrico por tempo superior a 2 segundos no mesmo minuto. A velocidade máxima alcançada ao longo dos três dias de teste foi utilizada para calcular o esforço submáximo, definido como o valor correspondente a 60% daquela velocidade.

### **3.3 Treinamento em esteira**

O treinamento físico forçado foi realizado na mesma esteira utilizada para aclimação e avaliação de desempenho. O regime de treinamento aeróbico foi realizado durante 30 dias consecutivos, por 30 minutos, com período de aquecimento e desaquecimento. A velocidade da esteira correspondeu a 60% do valor da velocidade submáxima alcançada durante a avaliação de desempenho de cada animal. Essa velocidade caracterizou treinamento de intensidade moderada. Todos os animais submetidos à avaliação de desempenho foram previamente

climatizados. Os grupos sedentários permaneceram no biotério de experimentação durante todo o período experimental.

### **3.4 Teste comportamental em campo aberto**

O teste em campo aberto (*open field*) é uma medida comum de comportamento exploratório e atividade geral em roedores, em que a qualidade e a quantidade da atividade podem ser avaliadas (Gould *et al.*, 2009). Roedores, quando colocados no centro de uma arena desconhecida sem pistas olfatórias, visuais ou auditivas, normalmente se direcionam para a borda e exploram todo o ambiente mantendo-se próximos à parede. Com o tempo, o animal habitua-se ao novo ambiente e sua ansiedade diminui, fazendo-o se aventurar cada vez mais em direção as partes centrais do campo antes de retornar para as bordas. A exploração deste perfil comportamental é a base do campo aberto (Brooks & Dunnet, 2009). Em estudos de parkinsonismo é amplamente utilizado para mensurar o impacto da intervenção lesiva (Chao *et al.*, 2012; Barbiero *et al.*, 2011; Prediger *et al.*, 2011 e 2006; Smith *et al.*, 2011; Aguiar *et al.*, 2009; Luchtman *et al.*, 2009; Pothakos *et al.*, 2009; Winner *et al.*, 2009; Rojo *et al.*, 2006).

O aparato consiste em uma caixa quadrada de madeira opaca medindo 60 cm x 60 cm x 30 cm, dividida em centro, borda e quadrantes; limpa com álcool 70° (Chao *et al.*, 2012; Luchtman *et al.* 2009) e livre de vestígios previamente a cada teste. Todos os testes foram filmados com uma câmera digital (Sony cyber-shot w510, Japão) localizada acima do aparato. Foi utilizado sempre o mesmo ambiente, com nível de ruído e iluminação adequados. Os testes foram realizados sempre pelo mesmo examinador, no mesmo período do dia e na mesma ordem de animais, nunca precedidos por qualquer alteração do microambiente do animal.

O teste consiste em colocar individualmente cada animal sempre no mesmo quadrante da caixa limpa (Anandhan *et al.*, 2012; Barbiero *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2011), filmar por 7 minutos seu comportamento exploratório sem a presença do experimentador, e, ao final do teste, retorná-lo a uma gaiola diferente da originária.

Os animais utilizados para realização dos testes comportamentais foram somente os dos grupos que permaneceram no experimento até 42 dias. Esse teste foi realizado no dia prévio à aclimação do animal à esteira (T0), no trigésimo dia de exercício em esteira (T1), e 21 (T2), 31 (T3) e 41 (T4) dias após a infusão intranasal de MPTP ou salina. Esse teste também foi realizado nos grupos de animais sedentários de mesma idade nos períodos citados acima.

Para a avaliação do teste de campo aberto selecionou-se doze variáveis, das inúmeras possíveis oferecidas pelo *software Any Maze*, que melhor se relacionavam com dois dos sinais cardinais da doença de Parkinson, bradicinesia e instabilidade postural. Analisou-se a distância percorrida, o número de quadrantes cruzados, as velocidade máxima e mínima, o tempo ativo (tempo total em que o animal realizou qualquer tipo de movimento), o tempo de *freezing* (período de imobilidade superior a 250 ms), número, duração e latência de *rearing* (atividade de exploração vertical), número, duração e latência de *grooming* (comportamento estereotipado relacionado à higiene). A variável mais amplamente utilizada é número de quadrantes cruzados, mas com o advento de *softwares* de análise, emergem diversas possibilidades e cada vez mais vem se analisando parâmetros como distância, velocidade, *rearing* e *grooming*.

Todos os vídeos foram analisados pelo mesmo examinador, sem conhecimento do grupo a que pertencia o animal, através do *software Any Maze* (Stoelting Company, EUA) cedido gentilmente pelo laboratório de neuropsicofarmacologia ICB/UFMG. Em cada um dos vídeos desprezou-se os primeiros e os últimos 10 segundos de gravação.

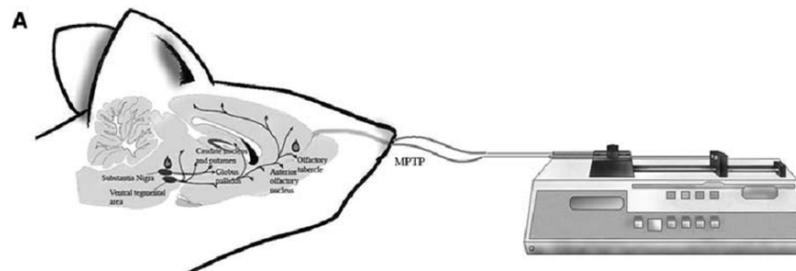
### **3.5 Infusão intranasal de MPTP**

O MPTP (Sigma-Aldrich, EUA) foi diluído em solução salina estéril, em capela de fluxo laminar, na concentração final de 20 mg/ml. Alíquotas de 100 µl (0,02 mg/µl) foram acondicionadas em tubos tipo *Eppendorf* estéreis e estocadas em freezer -20 °C.

Antes do procedimento de infusão intranasal, os animais foram levemente anestesiados com solução 2,2,2-tribromoetanol a 2,5% em solução salina (Sigma-

Aldrich, EUA) administrado por via intraperitoneal, no volume de 1 ml/100 g de peso corporal. Para infusão intranasal de MPTP, seguiu-se o procedimento adotado por Prediger *et al.* (2010, Moreira *et al.*, 2010) (Fig. 5). O volume de 50  $\mu$ l da solução estoque de MPTP foi infundido em cada narina através de uma cânula de polietileno PE-50 (Scientific Commodities Inc., EUA) conectada à microseringa Hamilton de 50  $\mu$ l em bomba de infusão (Cole Parmer 74900, EUA), na taxa de 12,5  $\mu$ l/min durante 4 minutos. Desse modo, cada animal recebeu a dose de 8 mg/Kg em volume final de 100  $\mu$ l. Após infusão, os animais foram mantidos sobre manta aquecida na temperatura de 46 °C até a recuperação da anestesia.

Durante a administração de MPTP, os experimentadores utilizaram equipamento de proteção individual composto de máscara hemifacial modelo 6200 (3M, Brasil), macacão modelo MAC001 (Biosorbents Absorventes Industriais, Brasil) e luvas. Após o término da sessão de infusão de MPTP, o ambiente foi adequadamente higienizado com hipoclorito de sódio a 4% e o material descartado de modo apropriado, de acordo com as recomendações da Sigma-Aldrich e com a revisão de segurança e uso de MPTP de Przedborski *et al.* (2001).



**Figura 5:** Representação esquemática da infusão intranasal (retirado de Prediger *et al.*, 2010).

### 3.6 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por dose letal do anestésico tribromoetanol (Sigma-Aldrich, EUA) a 2,5% em solução salina no 4º dia pós-infusão - para ver reações agudas ao MPTP e ao treinamento aeróbico - e 42º dia após a infusão - para observar os efeitos da droga ainda não avaliados pelo grupo da UFSC. Foram coletados fragmentos de duas regiões cerebrais - mesencéfalo ventral e estriado.

Esses fragmentos foram processados conforme descrito a seguir para cada uma das técnicas de análise.

### **3.7 Dosagem de fatores neurotróficos e citocinas (ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*)**

Os fragmentos frescos foram pesados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foram homogeneizados em tampão de lise (TRIS-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, NP40 1%, Glicerol 10%, Pepstatina A  $1\mu\text{M}$ , EDTA 10 mM, E-64  $10\mu\text{M}$ , Vanadato de sódio 0,5 mM) pelo *ultrasonic Processor* (Sonic Systems, EUA), centrifugadas (Jouan BR4i, Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) a 14.000 RPM, por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes resultantes foram aliquotados em tubos tipo *Eppendorf* e armazenados novamente a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Os níveis de proteínas foram obtidos pelo método ELISA sanduíche para quantificação de fatores neurotróficos GDNF e BDNF e citocinas IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Para ELISA de BDNF, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  foi utilizado o *kit* R&D Systems (EUA). As amostras de estriado e mesencéfalo ventral para dosagem de BDNF foram diluídas 1:1 em solução de 1% BSA (Albumina bovina sérica) (Sigma-Aldrich, EUA) em PBS (Tampão fosfato de sódio) filtrado, as demais amostras não sofreram diluição. Para ELISA de GDNF foi utilizado o *kit* Promega (EUA). As amostras de estriado foram diluídas 1:2 em solução fornecida pelo *kit* em água deionizada. Para ELISA de IL-6 e IL-10 foram utilizados o *kit* BD Biosciences (EUA) e amostras não sofreram diluição. Os procedimentos foram realizados de acordo com o recomendado pelos fabricantes dos *kits*.

A quantificação de proteína total foi realizada de acordo com o método Bradford (1976) de colorimetria. Utilizou-se leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices, EUA), com comprimento de onda de 450 nm. Os valores obtidos foram analisados pelo programa SOFTmax Pro versão 3.1.1 (Molecular Devices, EUA).

### 3.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão

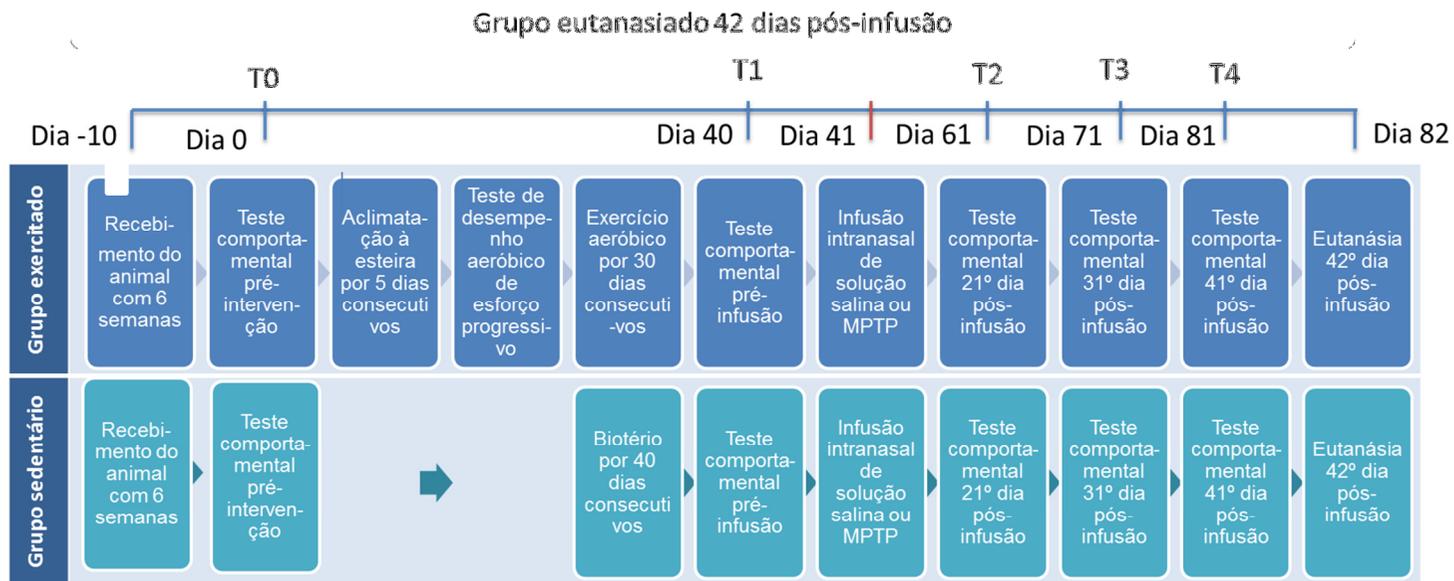
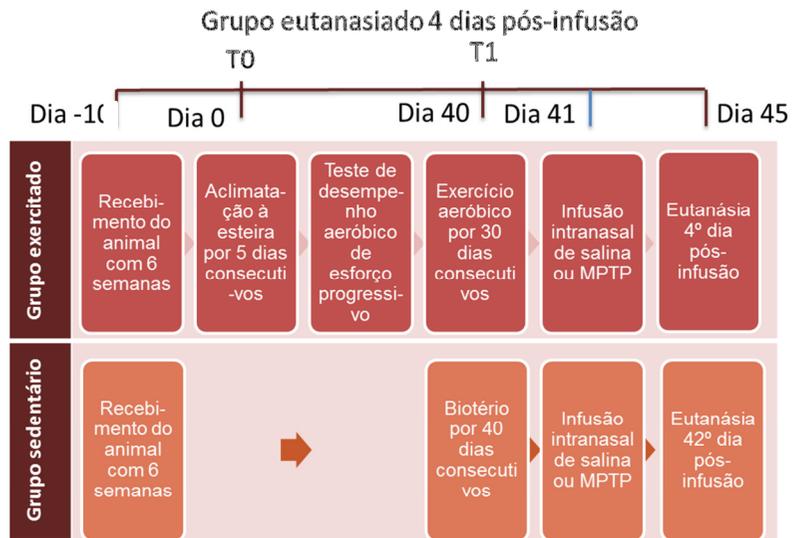
Os animais foram perfundidos por via intracardíaca com solução salina 0,9% heparinizada seguida por solução de *Karnovsky* modificada (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 a 7,4). Os fragmentos foram imersos na mesma solução fixadora por 24 horas. Todas as amostras foram encaminhadas ao Centro de Microscopia da UFMG para serem processadas para observação em microscopia eletrônica de transmissão. Secções ultrafinas foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 Spirit.

### 3.9 Análise estatística

Utilizou-se o programa estatístico Graphpad Prism 5 (GraphPad Software Inc., EUA) para Windows. Previamente as análises, realizou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Gibb's *outliers*. De acordo com a distribuição Gaussiana, aplicaram-se para amostras de dois grupos pareados os testes de Wilcoxon, se não paramétricas, ou teste T pareado, se paramétricas. Para amostras de dois grupos não pareados utilizou-se o teste de Mann-Whitney, caso não paramétricas ou teste T não pareado, caso paramétricas. Para análise intragrupo utilizou-se teste de Friedman e *post-hoc* Dunns ou *repeated measures of one-way ANOVA* quando as amostras eram pareadas e Kruskal Wallis ou *one-way ANOVA* e *post-hoc* Tukey quando não. Para análise intergrupos utilizou-se teste de *Two-way ANOVA*, *repeated measures of Two-way ANOVA* e *post-hoc* Bonferroni ou teste T quando tomados dois a dois havendo mudança de apenas uma variável categórica. Os dados são apresentados em média e desvio padrão e nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

### 3.10 Delineamento experimental

Os quadros a seguir representam a sequência de tratamentos a que cada um dos quatro grupos experimentais foi submetido.

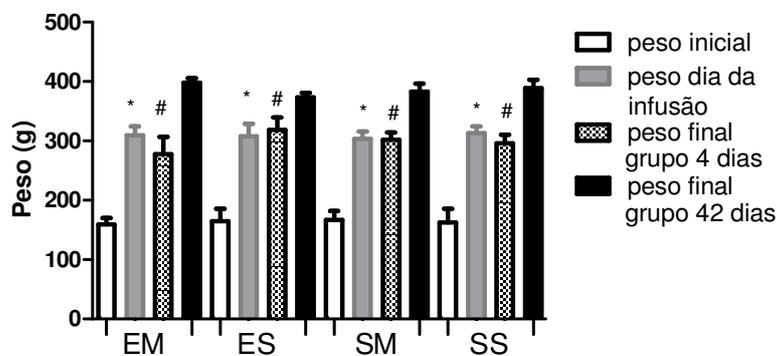


## **4 RESULTADOS**

## 4 Resultados

### 4.1 Peso corporal dos animais ao longo do período experimental

Os animais de todos os grupos, de acordo como teste *repeated measures one-way* ANOVA, apresentaram aumento de peso semelhante quando comparados os dois períodos, inicial (EM: 159,34 ± 33,28 g; ES: 164,31 ± 59,75 g; SM: 166,46 ± 46,16 g; SS: 162,34 ± 69,96 g) e o dia da infusão (EM: 309,06 ± 48,52 g; ES: 307,63 ± 59,66 g; SM: 303,18 ± 37,34 g; SS: 312,52 ± 35,82 g). Nos grupos eutanasiados aos 4 dias pós-infusão não se observou diferença no peso corporal dos animais entre o dia da infusão e o dia da eutanásia (EM 277,76 ± 91,59 g; ES: 317,94 ± 60,72 g; SM: 302,08 ± 35,87 g; SS: 295,67 ± 43,09 g). Já os grupos de animais que foram eutanasiados 42 dias pós-infusão apresentaram aumento de peso quando comparados o peso no dia da infusão ao peso final (EM 397,90 ± 22,83 g; ES: 373,39 ± 21,86 g; SM: 382,74 ± 37,90 g; SS: 388,96 ± 41,18 g) (Fig. 6). Nem o treinamento físico ou o tratamento com MPTP influenciaram o peso dos animais.



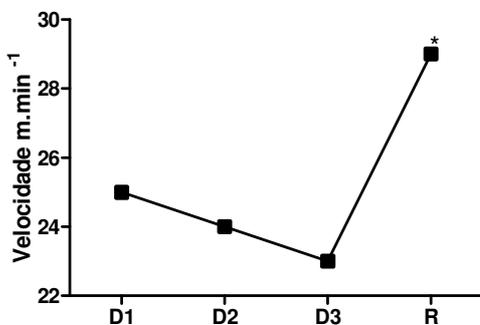
**Figura 6: Peso corporal médio (g) dos animais exercitados (E) e sedentários (S) durante o período experimental.** \* $p \leq 0,0001$ ; peso dia da infusão x peso inicial e peso final 42 dias de cada grupo. # $p < 0,0001$ ; peso final 4 dias x peso inicial de cada grupo.  $n=72$ .

### 4.2 Parâmetros relativos ao treinamento físico em esteira

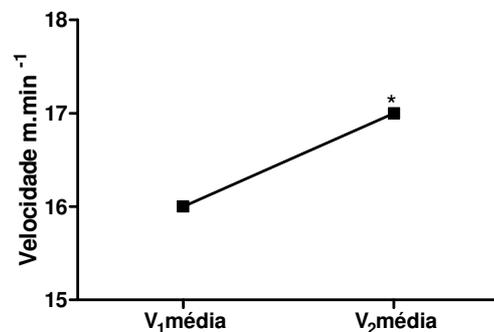
Na primeira avaliação de desempenho, realizada em três dias alternados no início do período experimental, os animais atingiram a velocidade de 11 - 4  $m \cdot min^{-1}$  e média ( $V_{média}$ ) de  $24,62 \pm 5,89 m \cdot min^{-1}$ . Após essa avaliação de desempenho, os animais correram durante 14 dias em velocidade correspondente a 60% da maior velocidade

submáxima alcançada. Tendo em vista o desempenho de cada um dos animais, a velocidade de corrida variou de 10 - 20 m.min<sup>-1</sup>. Assim, o grupo exercitado correu na V<sub>1</sub>média de 16,19 ± 2,55 m.min<sup>-1</sup> durante 14 dias e, nesse período, percorreu distância média de 485,70 m.dia<sup>-1</sup>.

Na reavaliação de desempenho realizada no 15º dia de treinamento, observou-se aumento da velocidade atingida em relação à primeira avaliação de desempenho, pelo teste de *repeated measures one-way* ANOVA (Fig. 7). Os animais atingiram velocidade de 15 - 36 m.min<sup>-1</sup> (Vmédia: 28,23 ± 4,50 m.min<sup>-1</sup>). Tendo em vista o desempenho de cada um dos animais nessa segunda avaliação, a velocidade de corrida no segundo período de 15 dias variou de 11 - 22 m.min<sup>-1</sup>. A velocidade média de corrida elevou-se para V<sub>2</sub>média 17,4 ± 2,26 m.min<sup>-1</sup>, sendo significativamente diferente da velocidade média inicial, pelo teste T pareado (Fig. 8). A distância percorrida pelos animais atingiu o valor médio de 522 m.dia<sup>-1</sup>. Esses dados mostram que os animais submetidos ao treinamento em esteira apresentaram, já aos 14 dias de execução, melhora desse parâmetro físico.



**Figura 7: Avaliação de desempenho aeróbico submáximo.** Velocidade submáxima média alcançada nos três dias de avaliação de desempenho aeróbico (D1, D2 e D3) prévio ao período de treinamento e na reavaliação realizada no 15º dia (R) de treinamento em esteira. \*p<0,0001 (R x D1, D2 e D3). n= 32.



**Figura 8: Velocidade média nos dois períodos de treinamento em esteira.** Velocidade média em esteira nos 14 primeiros dias de corrida (V<sub>1</sub>) e após reavaliação de desempenho aeróbico (V<sub>2</sub>). \*p=0,007. n= 32.

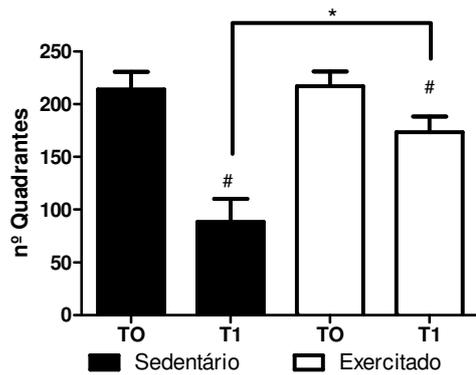
### 4.3 Avaliação de comportamento motor pelo teste de campo aberto de animais sedentários e exercitados por 30 dias em esteira

No 40° dia de período experimental (T1), equivalente aos períodos de aclimação (5 dias), avaliação de desempenho (3 dias alternados) e treinamento em esteira (30 dias), o grupo de animais sedentários apresentou declínio nos valores referentes a dois dos parâmetros analisados (Fig. 9 e 10): número de quadrantes cruzados (T0:  $214 \pm 44,53$ ; T1:  $88,5 \pm 52,89$ ) e número de *rearings* (T0:  $26,71 \pm 9,16$ ; T1:  $12,49 \pm 7,87$ ), por teste T pareado.

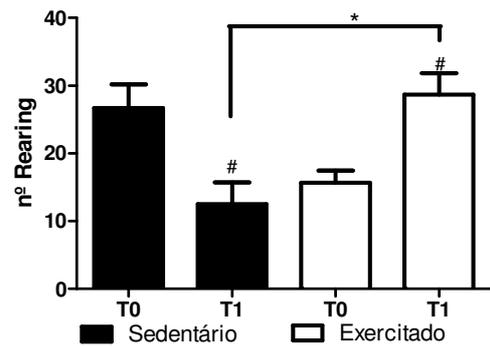
Nesse mesmo período T1, em teste T pareado, o grupo de animais exercitados apresentou elevação nos valores de três dos doze parâmetros avaliados, em relação a T0 (Fig. 10, 11 e 12): tempo ativo (T0:  $54,68 \pm 33,16$  s; T1:  $77,43 \pm 29,39$  s), número de *rearings* (T0:  $15,68 \pm 8,35$ ; T1:  $28,7 \pm 14,89$ ) e tempo de *rearings* (T0:  $22,3 \pm 16,75$  s; T1:  $51,69 \pm 30,41$  s). Por sua vez, a latência para realização do primeiro *rearing* foi menor (T0:  $18,92 \pm 15,78$  s; T1:  $10,68 \pm 8,48$  s) (Fig. 13). Esses dados sugerem que o animal após treinamento em esteira apresenta maior atividade em exploração vertical do ambiente.

Comparando-se os dois períodos (T0 e T1), em relação ao número de quadrantes cruzados observou-se declínio entre T0 e T1 em ambos os grupos (exercitados T0:  $216,91 \pm 66,84$ ; T1:  $173,40 \pm 71,40$ ; sedentário T0:  $214,00 \pm 44,53$ ; T1:  $88,50 \pm 52,89$ ) em teste T pareado. A comparação do número de quadrantes cruzados nos dois grupos de animais, em T0 e T1, indica um decréscimo mais acentuado no grupo sedentário (exercitados: decréscimo de 21 %, sedentários: decréscimo de 79%) (Fig. 9).

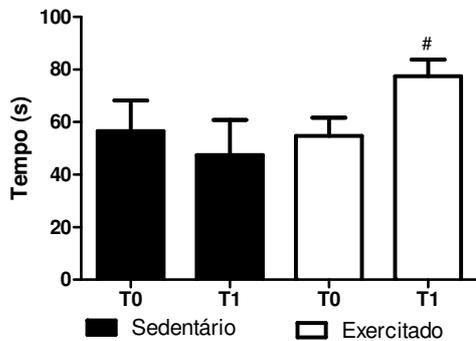
A comparação entre os grupos exercitado e sedentário, em T1, mostrou diferenças em quatro dos doze parâmetros sob efeito exclusivo da intervenção no teste *two-way* ANOVA. Houve aumento do número de quadrantes cruzados (sedentário:  $88,50 \pm 52,89$ ; exercitado:  $173,40 \pm 71,40$ ) ( $F_{17,05} = 21$ ;  $p = 0,0003$ ) (Fig. 9). Observou-se, também, aumento do número de *rearings* (sedentários:  $12,50 \pm 7,87$ ; exercitados:  $28,70 \pm 14,89$ ) ( $F_{18,20} = 19,39$ ;  $p = 0,0002$ ) (Fig. 10) e do tempo de *rearing* (sedentário:  $24,62 \pm 12,12$  s; exercitado:  $51,63 \pm 30,41$  s) ( $F_{8,73} = 9,26$ ;  $p = 0,006$ ) (Fig. 12). A velocidade média mostrou-se maior no grupo exercitado (sedentários:  $0,029 \pm 0,021$  m.min<sup>-1</sup>; exercitados:  $0,062 \pm 0,038$  m.min<sup>-1</sup>) ( $F_{3,78} = 6,76$ ;  $p = 0,03$ ) (Fig. 14).



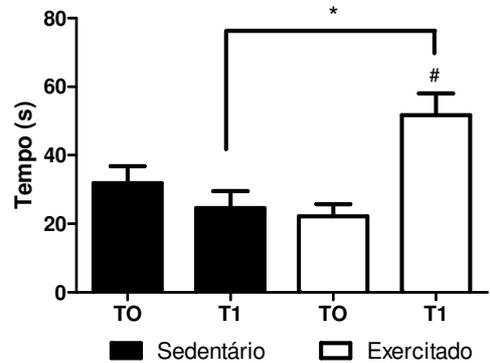
**Figura 9: Número de quadrantes cruzados por animais sedentários e exercitados.** T0 x T1  $^{\#}p<0,03$ . Sedentário x exercitado  $*p=0,0003$ . n=12-18.



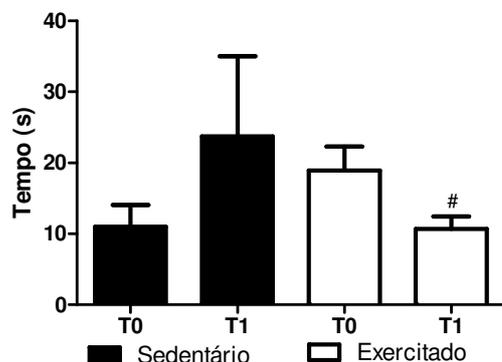
**Figura 10: Número de rearings em animais sedentários e exercitados.** T0 x T1  $^{\#}p<0,04$ ; Sedentário x exercitado  $*p<0,01$ . n=12-18.



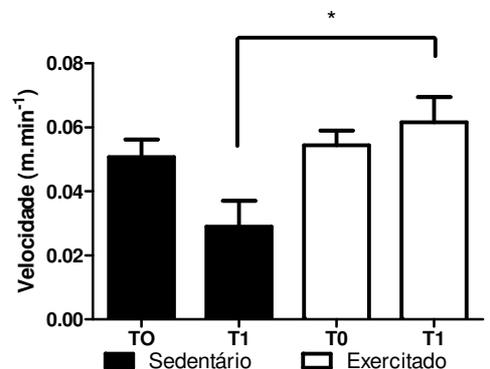
**Figura 11: Tempo ativo de animais sedentários e exercitados.** T0 x T1; sedentários:  $p=0,06$ ; exercitados:  $^{\#}p=0,003$ . Sedentário x exercitado  $p=0,2$ . n=12-18.



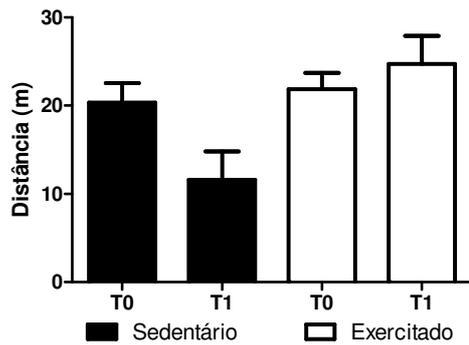
**Figura 12: Tempo de rearing em animais sedentários e exercitados.** T0 x T1; sedentários:  $p=0,09$ ; exercitados:  $^{\#}p=0,0001$ . Sedentário x exercitado  $*p<0,05$ . n=12-18.



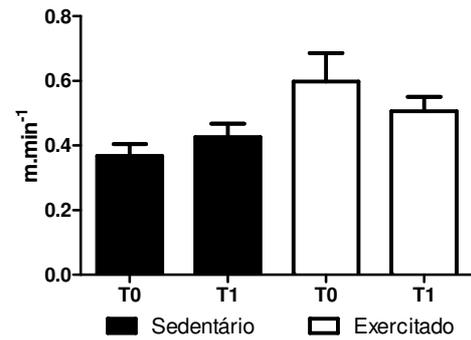
**Figura 13: Latência para realização do primeiro rearing em animais sedentários e exercitados.** T0 x T1; sedentários:  $p=0,3$ ; exercitados:  $^{\#}p=0,04$ . Sedentário x exercitado:  $p=0,4$ . n=12-18.



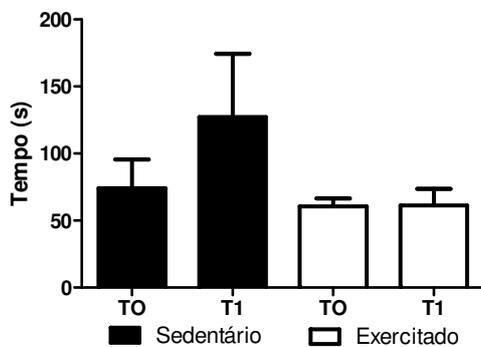
**Figura 14: Velocidade média de animais sedentários e exercitados.** T0 x T1, sedentário:  $p=0,1$ ; exercitado:  $p=0,3$ . Sedentário x exercitado  $*p=0,03$ . n=12-18.



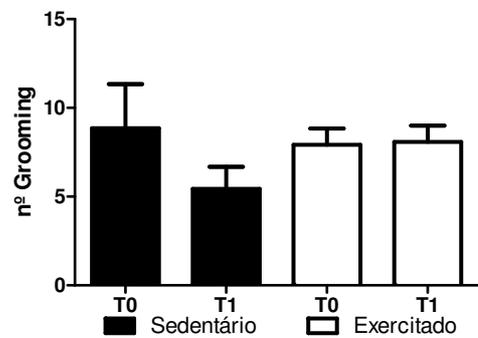
**Figura 15: Distância percorrida por animais sedentários e exercitados.** T0 x T1; sedentários:  $p=0,09$ ; exercitados:  $p=0,3$ . Sedentário x exercitado  $p=0,12$ .  $n=12-18$ .



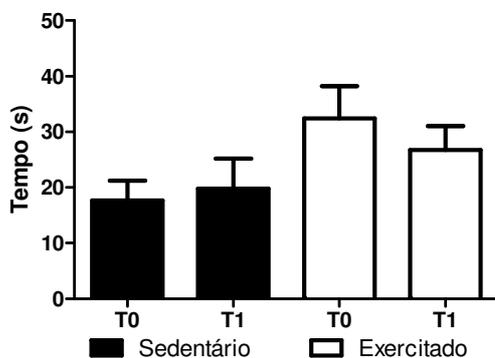
**Figura 16: Velocidade máxima de animais sedentários e exercitados.** T0 x T1; sedentário:  $p=0,17$ ; exercitados:  $p=0,3$ . Sedentário x exercitado  $p=0,85$ .  $n=12-18$ .



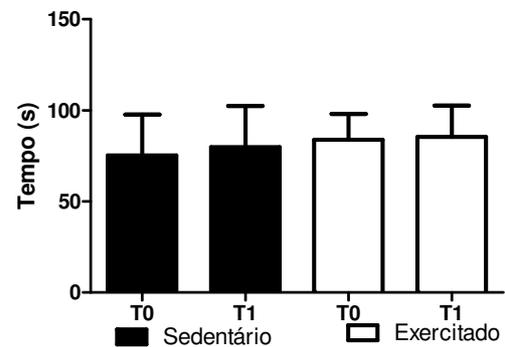
**Figura 17: Tempo de *freezing* de animais sedentários e exercitados.** T0 x T1; sedentário:  $p=0,34$ ; exercitados:  $p=0,66$ . Sedentário x exercitado  $p=0,17$ .  $n=12-18$ .



**Figura 18: Número de *groomings* de animais sedentários e exercitados.** T0 x T1; sedentário:  $p=0,3$ ; exercitados:  $p=0,8$ . Sedentário x exercitado  $p=0,58$ .  $n=12-18$ .



**Figura 19: Tempo de *grooming* de animais sedentários e exercitados.** T0 x T1; sedentário:  $p=0,97$ ; exercitados:  $p=0,5$ . Sedentário x exercitado  $p=0,16$ .  $n=12-18$ .



**Figura 20: Latência de *grooming* de animais sedentários e exercitados.** T0 x T1; sedentário:  $p=0,9$ ; exercitados:  $p=0,9$ . Sedentário x exercitado  $p=0,78$ .  $n=12-18$ .

Os parâmetros de distância percorrida, velocidade máxima, tempo de freezing, número, tempo e latência de *grooming* não apresentaram diferença estatística em nenhuma das comparações feitas (Fig. 15, 16, 17, 18, 19 e 20).

Nossos resultados indicam que o treinamento em esteira por 30 dias resulta em aumento da capacidade de locomoção e da curiosidade exploratória (*exploratory drive*) nos planos horizontal e vertical.

#### **4.4 Níveis de fatores neurotróficos no sistema nigroestriatal em resposta ao treinamento em esteira**

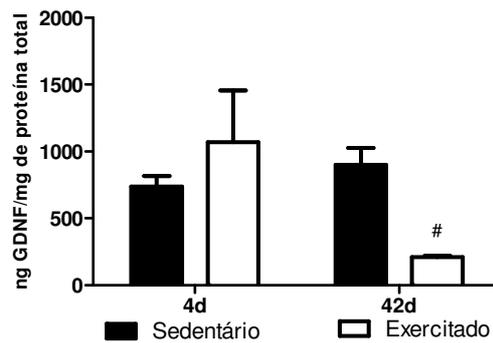
Os níveis dos fatores neurotróficos GDNF e BDNF no mesencéfalo ventral e estriado foram avaliados em dois pontos do período experimental, aos 4 e aos 42 dias após infusão intranasal de salina em animais exercitados e sedentários, pelo teste *two-way* ANOVA.

##### **4.4.1 Níveis de GDNF**

Os animais exercitados submetidos à infusão intranasal de salina mostraram que o treinamento em esteira por 30 dias não alterou os níveis estriatais de GDNF, uma vez que, aos 4 dias, os exercitados/salina apresentaram níveis semelhantes aos dos sedentários/salina (ES4:  $1.069 \pm 867$  ng/mg; SS4:  $736 \pm 175$  ng/mg).

Aos 42 dias, o grupo exercitado mostraram valores menores que aos 4 dias (ES42:  $230 \pm 20$  ng/mg; ES4:  $1.069 \pm 867$  ng/mg) ( $F_{5,63} = 23,62$ ;  $p=0,04$ ). Já os grupos sedentários mostraram níveis semelhantes aos 42 e aos 4 dias após infusão (SS42:  $900 \pm 286$  ng/mg; SS4:  $736 \pm 175$  ng/mg). Por isso discute-se a possibilidade de haver uma sujeição da síntese e metabolismo de GDNF à execução contínua do exercício físico.

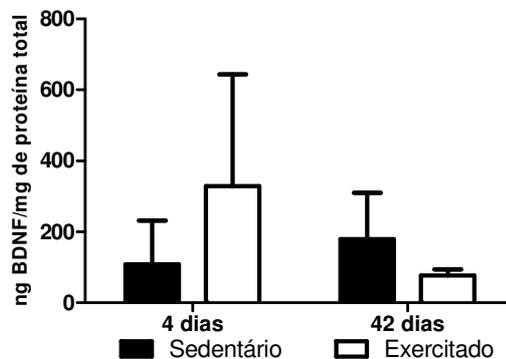
Neste trabalho, não analisamos os níveis de GDNF no mesencéfalo ventral porque as amostras coletadas não foram suficientes para realizar dosagem por ELISA.



**Figura 21: Níveis de GDNF em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina. # $p < 0,05$ ; (ES4 x ES42).  $n = 4-6$ .**

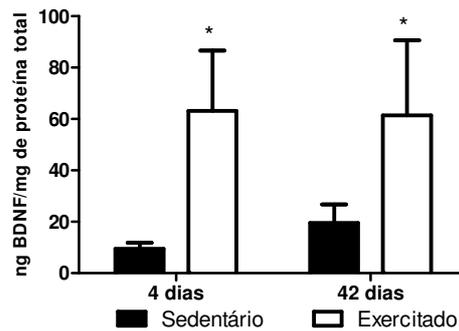
#### 4.4.2 Níveis de BDNF

No estriado, os animais exercitados e sedentários mostraram semelhantes níveis de BDNF aos 4 (SS4:  $108 \pm 124$  ng/mg; ES4:  $324 \pm 273$  ng/mg;) e aos 42 dias (SS42:  $179 \pm 131$  ng/mg; ES42:  $76 \pm 17$  ng/mg) após infusão, indicando que não há ação do treinamento em esteira sobre os níveis deste fator neurotrófico nas datas avaliadas.



**Figura 22: Níveis de BDNF em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.  $p > 0,05$ .  $n = 4-6$ .**

Em relação ao mesencéfalo ventral, aos 4 dias, os animais exercitados salina (ES4:  $63 \pm 40$  ng/mg) apresentaram níveis maiores de BDNF que os sedentários salina de mesma idade (SS4:  $7.5 \pm 4.6$  ng/mg). Essa diferença se repete aos 42 dias (ES42:  $80 \pm 76$  ng/mg; SS42:  $19 \pm 15$  ng/mg), indicando que há apenas impacto da intervenção e não do tempo ou a interação entre eles ( $F_{98,66} = 45,57$ ;  $p = 0,002$ ).

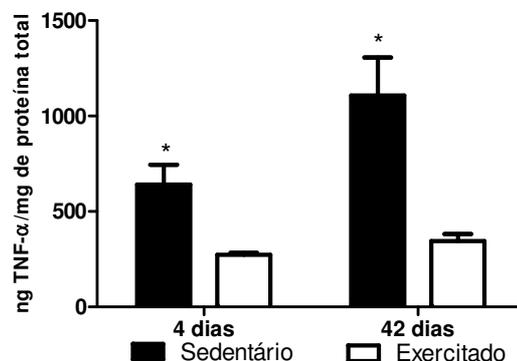


**Figura 23: Níveis de BDNF em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina . \* $p < 0,05$ ; (ES4 x SS4; ES42 x SS42). n=3-5.**

#### 4.5 Níveis de citocinas no sistema nigroestriatal em resposta ao treinamento em esteira

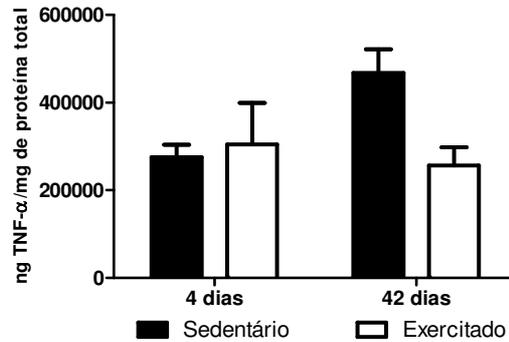
##### 4.5.1 Níveis de TNF- $\alpha$

Aos 4 dias, os animais do grupo exercitado (ES4:  $272 \pm 22$  ng/mg) apresentaram níveis estriatais de TNF- $\alpha$  menores que o grupos de animais sedentários (SS4:  $640 \pm 209$  ng/mg). Essa diferença se manteve aos 42 dias (ES42:  $344 \pm 74$  ng/mg; SS42:  $1107 \pm 399$  ng/mg), sob efeito exclusivo da intervenção ( $F_{113,5}=52,39$ ,  $p < 0,0001$ ). Logo, o treinamento físico diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  no estriado em curto e médio prazo.



**Figura 24: Níveis de TNF- $\alpha$  em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina. \* $p < 0,001$ ; (ES4 x SS4; ES42 x SS42). n=4.**

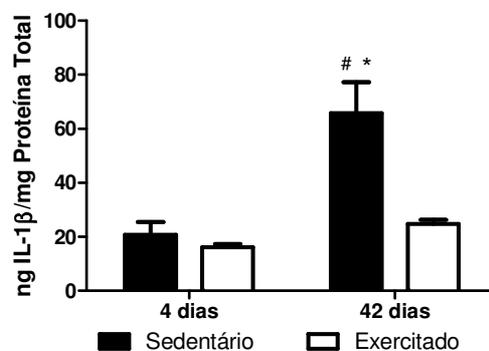
O treinamento físico não alterou os níveis de TNF- $\alpha$  no mesencéfalo ventral aos 4 ou aos 42 dias (SS4:  $284 \pm 67$  ng/mg; ES4:  $305 \pm 190$  ng/mg; SS42:  $468 \pm 106$  ng/mg; ES42:  $256 \pm 84$  ng/mg), porém há indicativo de efeito da intervenção ( $F_{7,43}=11,67$ ,  $p<0,03$ ).



**Figura 25: Níveis de TNF- $\alpha$  em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.  $p>0,05$ .  $n=4$ .**

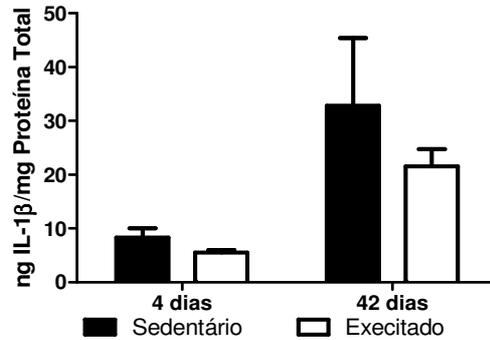
#### 4.5.2 Níveis de Interleucina 1 $\beta$

Aos 4 dias, os grupos apresentaram níveis semelhantes de IL-1 $\beta$ . Aos 42 dias, o grupo ES42 (ES42:  $24 \pm 4$  ng/mg) apresentou níveis menores que o grupo SS42 (SS42:  $66 \pm 23$  ng/mg) ( $F_{8,87}=25,24$ ;  $p<0,02$ ). Já comparando os dois períodos avaliados, observa-se elevação dos níveis de IL-1 $\beta$  entre SS4 e SS42 (SS4:  $19 \pm 8$  ng/mg; SS42:  $66 \pm 23$  ng/mg) ( $F_{33,21} = 35,06$ ,  $p<0,001$ ), não observado entre os animais exercitados (ES4:  $16 \pm 2$  ng/ml; ES42:  $24 \pm 4$  ng/mg), indicando que possa haver uma modulação dos níveis desta citocina pelo treinamento físico.



**Figura 26: Níveis de IL-1 $\beta$  em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina. \* $p<0,01$ ; (SS42 x ES42). # $p<0,001$ ; (SS4 x SS42).  $n=4$ .**

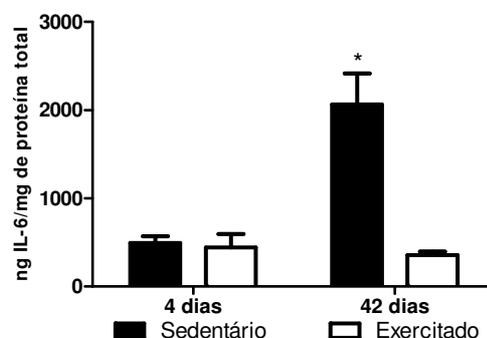
Em relação ao mesencéfalo ventral, não foi encontrada diferença entre os grupos em qualquer dos períodos experimentais avaliados (SS4:  $8 \pm 3$  ng/mg; ES4:  $5 \pm 2$  ng/mg; SS42:  $32 \pm 25$  ng/mg; ES42:  $21 \pm 7$  ng/mg), embora haja efeito do tempo ( $F_{8,07}=41,51$ ,  $p<0,02$ ).



**Figura 27:** Níveis de IL-1 $\beta$  em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.  $p>0,05$ .  $n=3-4$ .

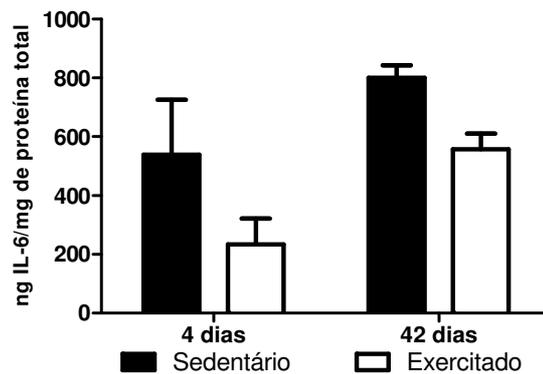
#### 4.5.3 Níveis de Interleucina 6

Aos 4 dias, todos os grupos apresentam níveis semelhantes de IL-6 no estriado (SS4:  $640 \pm 353$  ng/mg; ES4:  $444 \pm 304$  ng/mg). Aos 42 dias, o grupo sedentário salina (SS42:  $2064 \pm 705$  ng/mg) expressou níveis de IL-6 superiores ao grupo exercitado da mesma data (ES42:  $353 \pm 88$  ng/mg), considerando os efeitos da intervenção ( $F_{23,01}=31,26$ ,  $p=0,003$ ), o tempo ( $F_{12,44}=22,07$ ,  $p=0,012$ ) e a interação entre eles ( $F_{15,71}=27,87$ ,  $p=0,007$ ). O treinamento físico parece não exercer efeito sobre os níveis de IL-6 no estriado.



**Figura 28:** Níveis de IL-6 em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.  $*p<0,0001$ ; (SS42 x ES42).  $n=4$ .

Aos 4 e aos 42 dias, todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de IL-6 no mesencéfalo ventral, porém é notável os efeitos do tempo ( $F_{7,62}=28,33$ ,  $p=0,033$ ) e do tratamento ( $F_{6,12}=24,27$ ,  $p=0,04$ ). Além disso, o grupo ES apresentou elevação dos níveis de IL-6 entre os períodos experimentais (ES4:  $233 \pm 175$  ng/mg; ES42:  $557 \pm 105$  ng/mg) numa proporção de 239% enquanto os nível de IL-6 no grupo SS (SS4:  $539 \pm 374$  ng/mg; SS42:  $801 \pm 82$  ng/mg) se elevaram numa proporção de 148% , sugerindo uma modulação dos níveis dessa citocina pelo treinamento físico.



**Figura 29: Níveis de IL-6 em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina.  $p>0,05$   $n=4$ .**

#### 4.5.4 Níveis de Interleucina 10

O treinamento físico parece exercer efeito depressor nos níveis de IL-10 quando se compara o grupo exercitado ao grupo sedentário aos 4 (ES4:  $185 \pm 2$  ng/mg; SS4:  $420 \pm 298$  ng/mg) e aos 42 dias (SS42:  $241 \pm 63$  ng/mg; ES42:  $75 \pm 19$  ng/mg), ( $F_{9,98}=29,33$ ,  $p<0,02$ ).

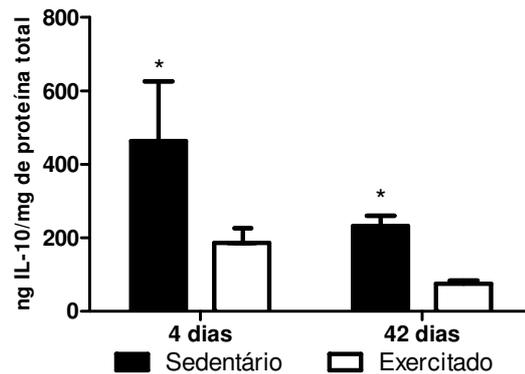


Figura 30: Níveis de IL-10 em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de salina. \* $p < 0,05$ ; (SS4 X ES4 e SS42 x ES42).  $n=4-5$ .

#### 4.6 Efeito da infusão intranasal de MPTP sobre o comportamento motor em campo aberto de animais sedentários e exercitados em esteira após a infusão de MPTP ou salina

Os grupos sedentário salina (SS), sedentário MPTP (SM), exercitado salina (ES) e exercitado MPTP (EM) foram avaliados em campo aberto, no período prévio à infusão (T1) e 21 (T2), 31 (T3) e 41 (T4) dias após a infusão intranasal de MPTP ou salina.

Em relação à distância percorrida (Fig. 31), os animais exercitados em esteira, submetidos ou não à infusão intranasal de MPTP, apresentaram valores semelhantes aos de animais sedentários submetidos ou não ao MPTP em todos os períodos com exceção de T4. Neste ponto, os exercitados (ES T4:  $27,65 \pm 10,81$  m; EM T4:  $26,28 \pm 7,11$  m) apresentaram maior desempenho que os sedentários (SS T4:  $17,83 \pm 9,87$  m; SM T4:  $20,84 \pm 10,35$  m), pelo teste de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunns.

Em relação ao número de quadrantes cruzados, pelo teste *two-way* ANOVA e *post-hoc* de Bonferroni, sob influência da intervenção ( $F_{2,44}=38,8$ ,  $p=0,0004$ ), o grupo EM (EM T3:  $209,4 \pm 59,82$ ) mostrou melhor desempenho que o grupo SM (SM T3:  $137,3 \pm 59,97$ ) (Fig. 32) em T3. O grupo EM apresenta uma elevação em T3 quando comparado a T2 (EM T2:  $142,9 \pm 51,88$ ; EM T3:  $209,4 \pm 59,82$ ), pelo teste *repeated measures one-way* ANOVA, não observada em nenhum outro grupo.

Os resultados acima levantam a questão se houve uma interação dos efeitos metabólicos causados pelo treinamento com os gerados pelo MPTP, ou se a droga interage de forma desigual nos dois tipos de intervenção prévia. O grupo exercitado não mostrou efeitos do MPTP sobre esse parâmetro em qualquer dos tempos avaliados.

A velocidade máxima (Fig. 33) mostrou-se aumentada no grupo ES quando se compara T1 e T4 (ES T1:  $0,484 \pm 0,169 \text{ m.min}^{-1}$ ; T4:  $0,787 \pm 0,297 \text{ m.min}^{-1}$ ) e diminuída no grupo SS quando se compara T3 e T4 (SS T3:  $0,734 \pm 0,284 \text{ m.min}^{-1}$ ; SS T4:  $0,456 \pm 1,791 \text{ m.min}^{-1}$ ), pelo teste *repeated measures one-way ANOVA* e *post-hoc Tukey*. A condição motora dos animais exercitados permanece diferente dos animais sedentários por até 42 dias. Esse fato é corroborado pela diferença estatística na data T4 entre SS (SS T4:  $0,456 \pm 1,791 \text{ m.min}^{-1}$ ) e ES (ES T4:  $0,787 \pm 0,297 \text{ m.min}^{-1}$ ), pelo teste *two-way ANOVA* e *post-hoc* de Bonferroni por influência da interação tempo e tratamento ( $F_{2,78} = 12,10$   $p=0,03$ ). Em relação ao efeito do MPTP, no tempo T2, o grupo SM (SM T2:  $0,497 \pm 0,135 \text{ m.min}^{-1}$ ) apresenta menor velocidade quando comparado ao seu controle SS (SS T2:  $0,732 \pm 0,229 \text{ m.min}^{-1}$ ), pelo teste *repeated measures one-way ANOVA* e *post-hoc Tukey*, sugerindo uma ação pontual do MPTP.

Comparando-se o tempo ativo dos grupos avaliados (Fig. 34), perceberam-se os efeitos do MPTP na diminuição progressiva da atividade dos animais sedentários (SM T1:  $63,76 \pm 21,07 \text{ s}$ ; SM T3:  $43,92 \pm 14,52 \text{ s}$ ) e sua estabilização de T3 para T4 (SM T2:  $48,09 \pm 39,72 \text{ s}$ ), pelo teste *repeated measures one-way ANOVA* e *post-hoc Tukey*. Esse declínio não foi observado no grupo sedentário salina (SS) em qualquer dos tempos analisados. No entanto, pelo teste *two way ANOVA*, *post-hoc* Bonferroni e influência do tratamento ( $F_{4,48} = 6,18$ ,  $p=0,004$ ), o grupo exercitado submetido à infusão com MPTP (EM), não apresentou declínio nos valores desse parâmetro ao longo do período. De fato, em T3, esse grupo apresentou maiores valores de tempo ativo em relação aos outros períodos e em relação aos sedentários MPTP. Isto sugere que o MPTP tem efeito sobre o tempo ativo dos animais sedentários e interage de modo diferente com os exercitados. Essa interação entre treinamento físico e MPTP é sustentada pelo aumento do tempo ativo do grupo EM em T3 (EM T3:  $74,88 \pm 29,84 \text{ s}$ ) comparado ao SM. Da mesma forma, seu controle ES em T3

apresenta uma queda no tempo ativo quando comparado a ES T1 (ES T1:  $76,13 \pm 25,35$  s), pelo teste de Friedman e *post-hoc* de Dunns.

O tempo de *freezing* (Fig. 35), pelo teste *two-way* ANOVA e *post-hoc* de Bonferroni e sob influência do tratamento ( $F_{11,53} = 14,52$ ;  $p=0,0001$ ), mostrou-se menor no grupo de animais exercitados salina em T2 (ES T2:  $47,85 \pm 18,53$  s; SS T2:  $97,01 \pm 69,18$  s;) e T3 (ES T3:  $56,15 \pm 20,01$  s; SS T3:  $116,8 \pm 89,88$  s), em relação ao grupo sedentário salina correspondente. Em relação aos efeitos do MPTP, observa-se que animais sedentários apresentam maior tempo de *freezing* que os exercitados em T3 (SM T3:  $85,99 \pm 24,49$  s; EM T3:  $39,83 \pm 11,98$  s) e em T4 (SM T4:  $119,28 \pm 85,19$  s; EM T4:  $58,27 \pm 19,54$  s). Esses dados sugerem que o treinamento físico diminui o tempo de *freezing* no grupo salina e interfere com a resposta ao MPTP. É interessante notar que no grupo EM, pelo teste de Friedman e *post-hoc* de Dunns, há decréscimo da média de T3 (EM T3:  $39,83 \pm 11,98$  s) em relação a T2; (EM T2:  $53,56 \pm 20,65$  s) e T4 (EM T4:  $58,27 \pm 19,54$  s), sendo, portanto, a terceira variável que se modifica no tempo T3 para este grupo. Essa diminuição do tempo de *freezing* corrobora o aumento do tempo ativo e do número de quadrantes cruzados encontrado para este grupo, indicando uma interação diferente do MPTP com animais exercitados e relevando esta data de 31 dias pós-infusão.

Considerando número de *rearings* (Fig. 36), o grupo de animais exercitados, pelo teste *repeated measures one-way* ANOVA e *post-hoc* Tukey, apresentou decréscimo entre T1 e T4 (T1:  $29,25 \pm 14,53$ ; T4:  $19,08 \pm 9,65$ ), sugerindo que, neste quesito, os efeitos do treinamento físico prévio não perduram até 41 dias. Os animais sedentários apresentam valores semelhantes ao longo do período experimental. A comparação entre sedentários e exercitados, pelo teste *two-way* ANOVA, *post-hoc* Bonferroni e influência do tratamento ( $F_{8,73} = 28,83$ ;  $p=0,0002$ ), mostra diferença apenas em T2 (ES T2:  $25,17 \pm 6,60$ ; SS T2:  $12,21 \pm 6,86$ ). Além disso, os grupos de animais exercitados mostraram maiores valores que os sedentários, após infusão de MPTP, em T2 (SM:  $13,25 \pm 9,3$ ; EM T2:  $25,14 \pm 9,04$ ), em T3 (EM:  $27,54 \pm 12,09$ ; SM:  $10,18 \pm 4,51$ ) e em T4 (EM T4:  $22,40 \pm 9,11$ ; SM T4:  $11,00 \pm 7,71$ ). Essa diferença se acentua em T3.

Ainda analisando a exploração vertical no parâmetro tempo de *rearing* (Fig. 37) pelo teste *two-way* ANOVA, *post-hoc* de Bonferroni e influência do tratamento ( $F_{15,59} =$

18,79;  $p=0,0001$ ), o grupo de animais exercitados salina apresentou maiores valores que os sedentários salina apenas em T1 (ES:  $48,70 \pm 26,87$  s; SS:  $27,88 \pm 14,68$  s). Após infusão de MPTP, o grupo de animais exercitados mostrou valores maiores que os sedentários em T2, T3 e T4 (EM T2:  $47,07 \pm 24,99$  s; SM T2:  $22,72 \pm 12,63$  s; EM T3:  $51,34 \pm 28,05$  s; SM T3:  $16,14 \pm 11,10$  s; EM T4:  $43,66 \pm 21,07$  s; SM T4:  $20,01 \pm 16,53$  s). O grupo SM apresentou diminuição no tempo de *rearing* quando comparado T3 e T2, pelo teste *repeated measures one-way ANOVA*, (SM T2:  $22,72 \pm 12,63$  s; SM T3:  $16,14 \pm 11,10$  s). Por fim, cabe ressaltar que, novamente, há aumento na atividade locomotora do grupo EM em T3.

Concluindo a análise comportamental, analisaremos agora o número de *groomings* (Fig. 38) e latência para realização de sua primeira execução (Fig. 39). Há um decréscimo do número de *groomings* no grupo SM quando comparam-se os tempos T1 (SM T1:  $10,00 \pm 6,208$ ) e T4 (SM T4:  $4,875 \pm 5,139$ ), pelo teste de Friedman e *post-hoc* de Dunns, concomitante ao aumento da latência nas mesmas datas (SM T1:  $56,14 \pm 39,56$  s; SM T4:  $180,0 \pm 160,1$  s), pelo teste *repeated measures one-way ANOVA*, fato não observado em seus controles. A latência de SM em T4 é maior que todos os outros grupos na mesma data (SS T4:  $117,5 \pm 84,98$  s; ES T4:  $96,01 \pm 63,12$  s; EM T4:  $86,53 \pm 50,39$  s), pelo teste *two-way ANOVA* e *post-hoc* de Bonferroni sob influência do tempo ( $F_{4,74}=6,84$ ;  $p=0,0033$ ).

Os parâmetros que não apresentaram diferença estatisticamente significativa foram velocidade média (Fig. 40), latência ao primeiro *rearing* (Fig. 41) e tempo de *grooming* (Fig. 42).

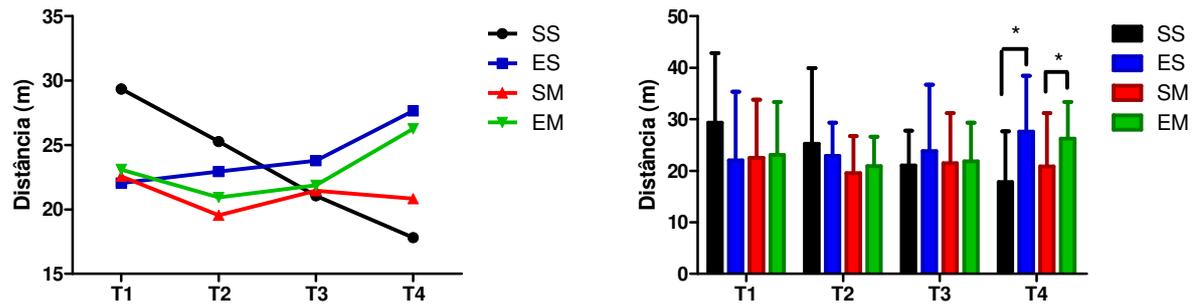


Figura 31: Distância percorrida de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP. \* $p=0,04$  (SS x ES em T4, SM x EM em T4).  $n=6-9$ .

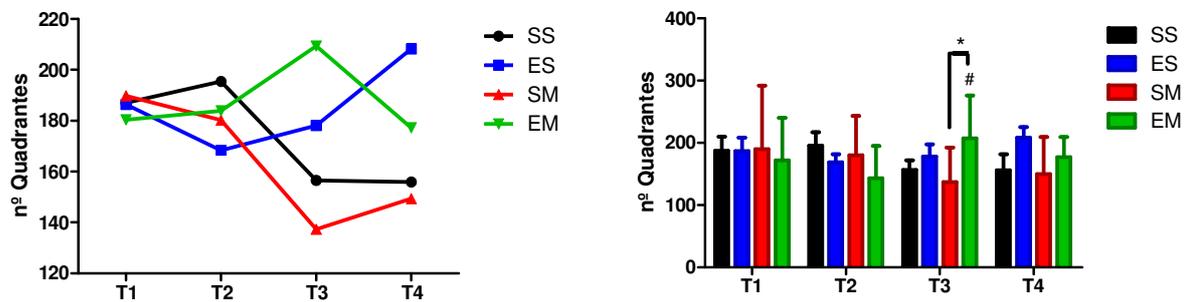


Figura 32: Número de quadrantes cruzados por animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP. \* $p<0,05$  (SM x EM em T3). # $p=0,03$  (grupo EM T2 x T3).  $n=6-9$ .

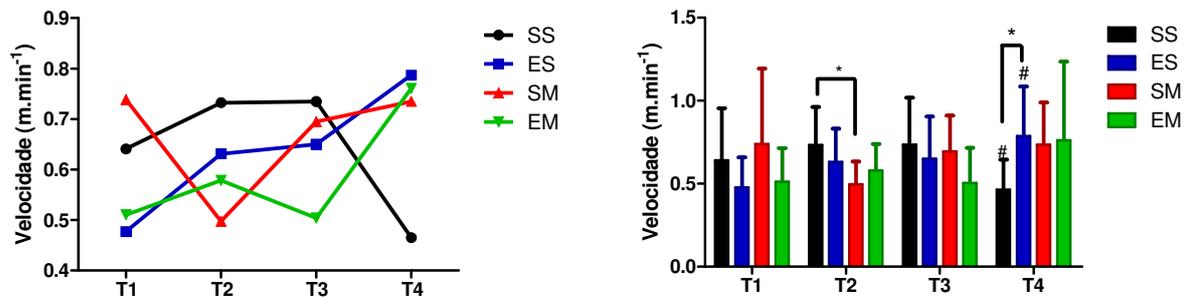
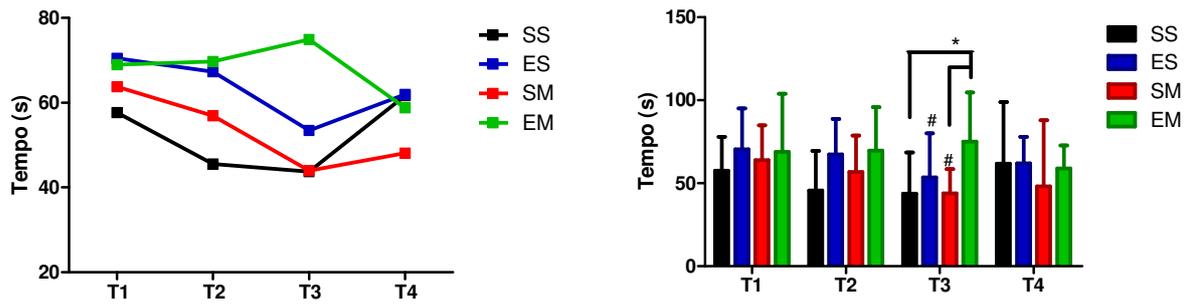
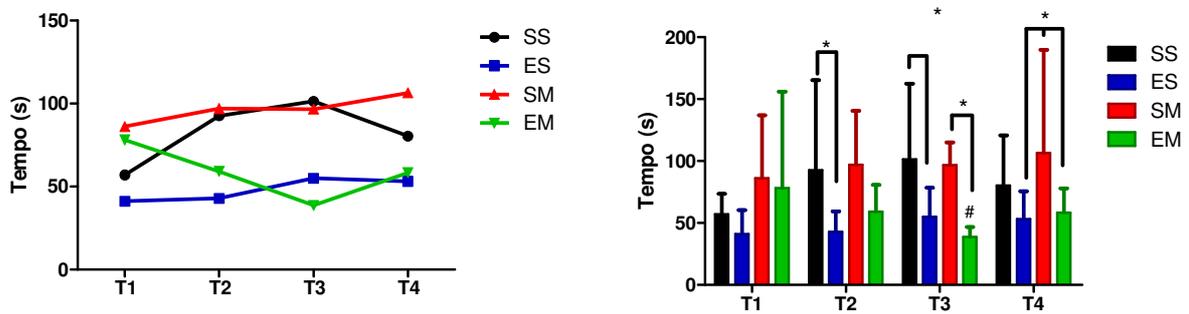


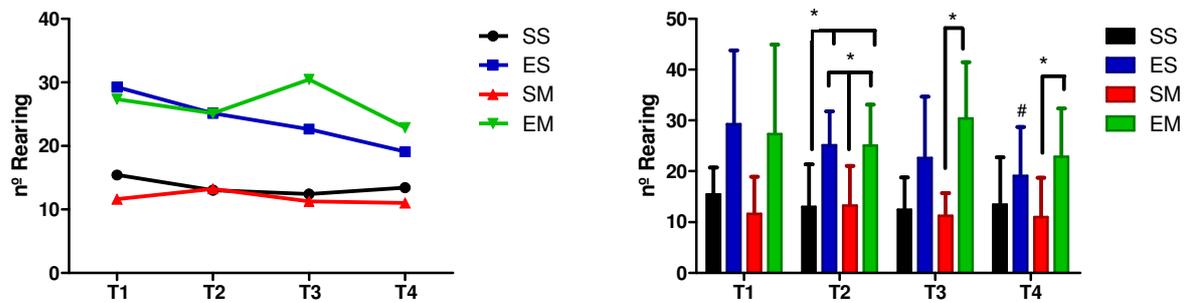
Figura 33: Velocidade máxima de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP. \* $p<0,05$  (SS x SM em T2 e SS x ES T4). # $p<0,03$  (grupo ES T1 x T4, grupo SS T3 x T4).  $n=6-9$ .



**Figura 34: Tempo ativo de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP.** \* $p < 0,01$  (EM x SS e SM em T3). # $p < 0,02$  (grupo ES T1 x T3; SM T1 x T3).  $n = 6-9$ .



**Figura 35: Tempo de *freezing* de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP.** \* $p < 0,05$  (SS x ES em T2, EM x SM em T3, SM x ES e EM x em T4). # $p = 0,008$  (grupo EM em T3 X T2 e T4).  $n = 6-9$ .



**Figura 36: Número de *rearings* de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP.** \* $p < 0,01$  (SS x ES e EM em T2; SM x ES e EM em T2, SM x EM em T3 e T4). # $p = 0,04$  (grupo ES T1 x T4).  $n = 6-9$ .

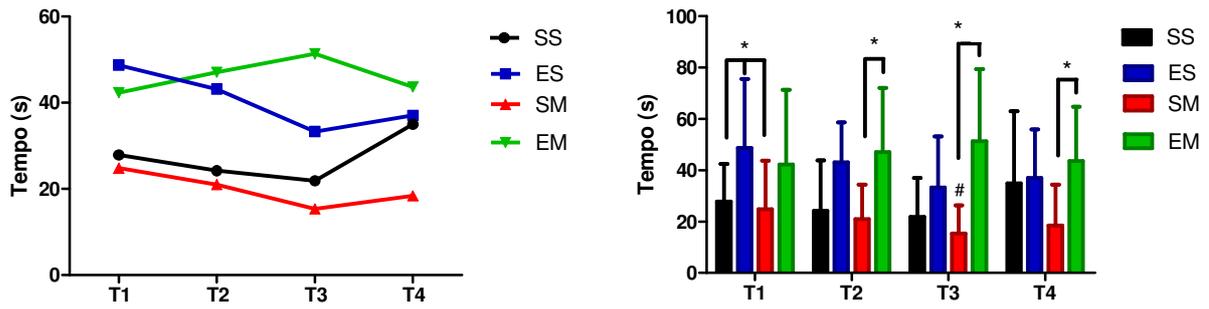


Figura 37: Tempo de *rearing* de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP. \* $p < 0,05$  (ES x SS e SM em T1, SS x EM em T2, SM x EM em T3, SM x EM em T4). # $p = 0,009$  (grupo SM em T3 x T2).  $n = 6-9$ .

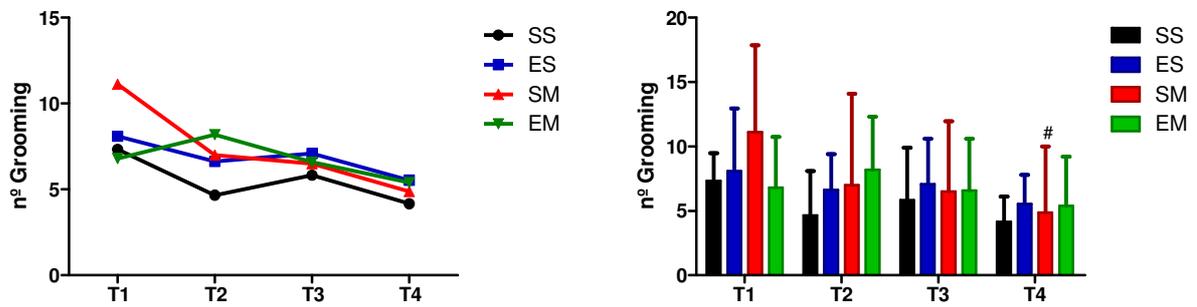


Figura 38: Número de *groomings* de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP. # $p = 0,01$  (grupo SM T1 x T4).  $n = 6-9$ .

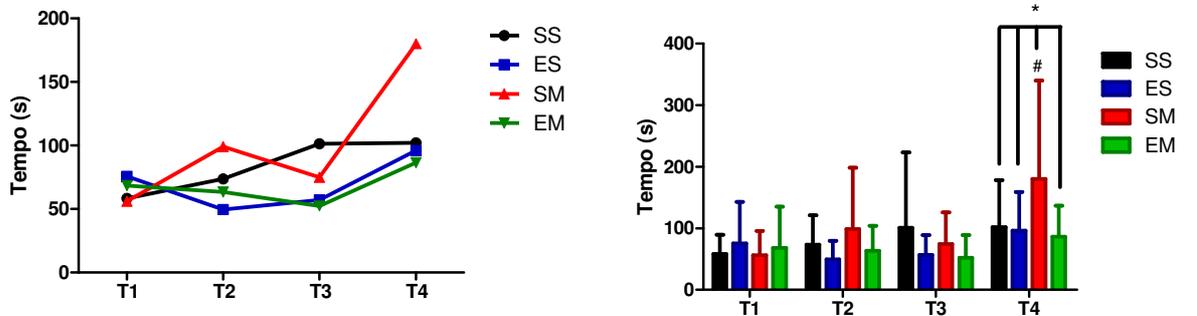
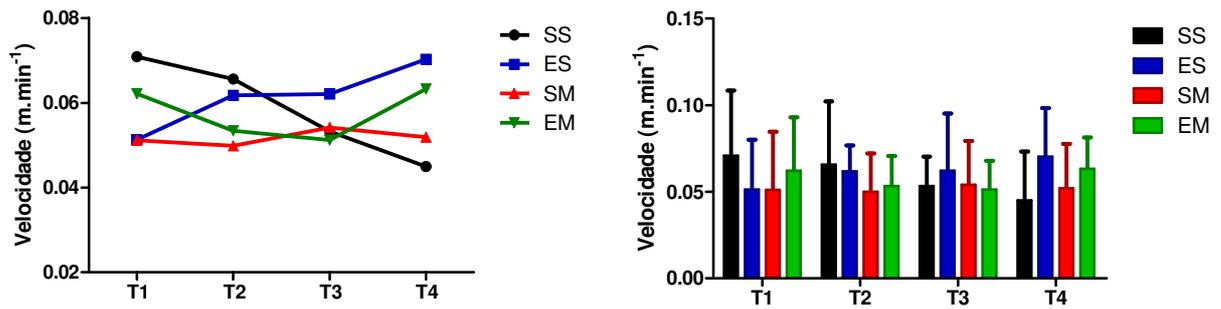
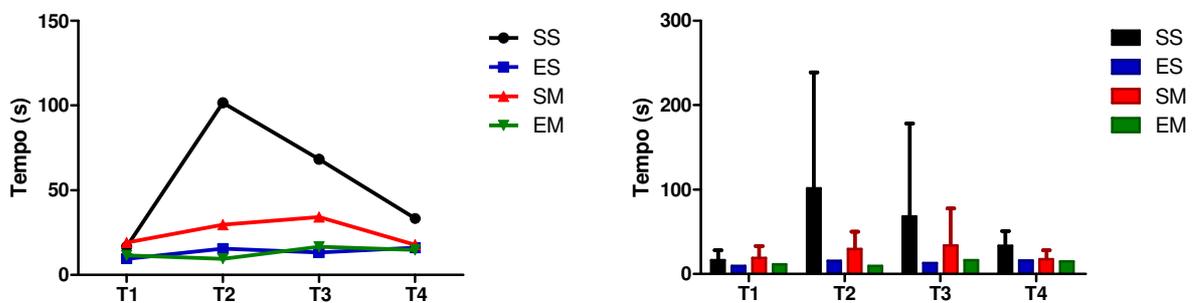


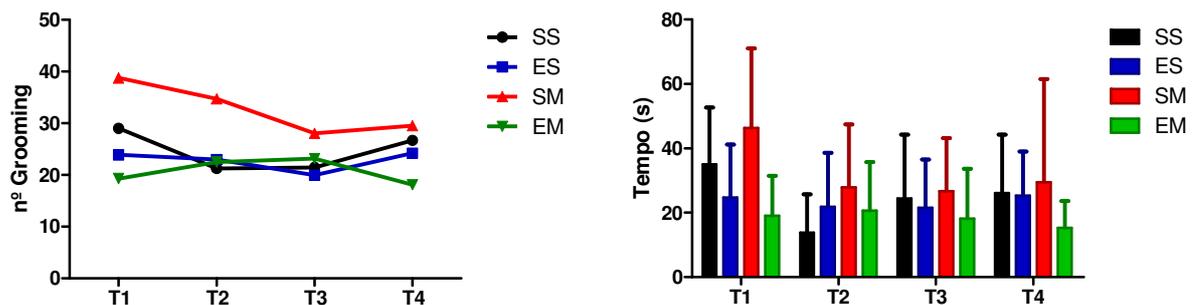
Figura 39: Latência ao primeiro *grooming* de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP. \* $p < 0,05$  (SM x SS, CS e CM em T4). # $p = 0,03$  (grupo SM em T4 x T1).  $n = 6-9$ .



**Figura 40: Velocidade média de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP.** Comparação entre os tempos SS:  $p=0,2$ ; ES:  $p=0,5$ ; SM:  $p=0,9$ ; EM:  $p=0,6$ . Comparação entre os grupos:  $p>0,05$ .  $n=6-9$ .



**Figura 41: Latência ao primeiro rearing de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP.** Comparação entre os tempos SS:  $p=0,5$ ; ES:  $p=0,4$ ; SM:  $p=0,5$ ; EM:  $p=0,6$ . Comparação entre os grupos:  $p>0,05$ .  $n=6-9$ .

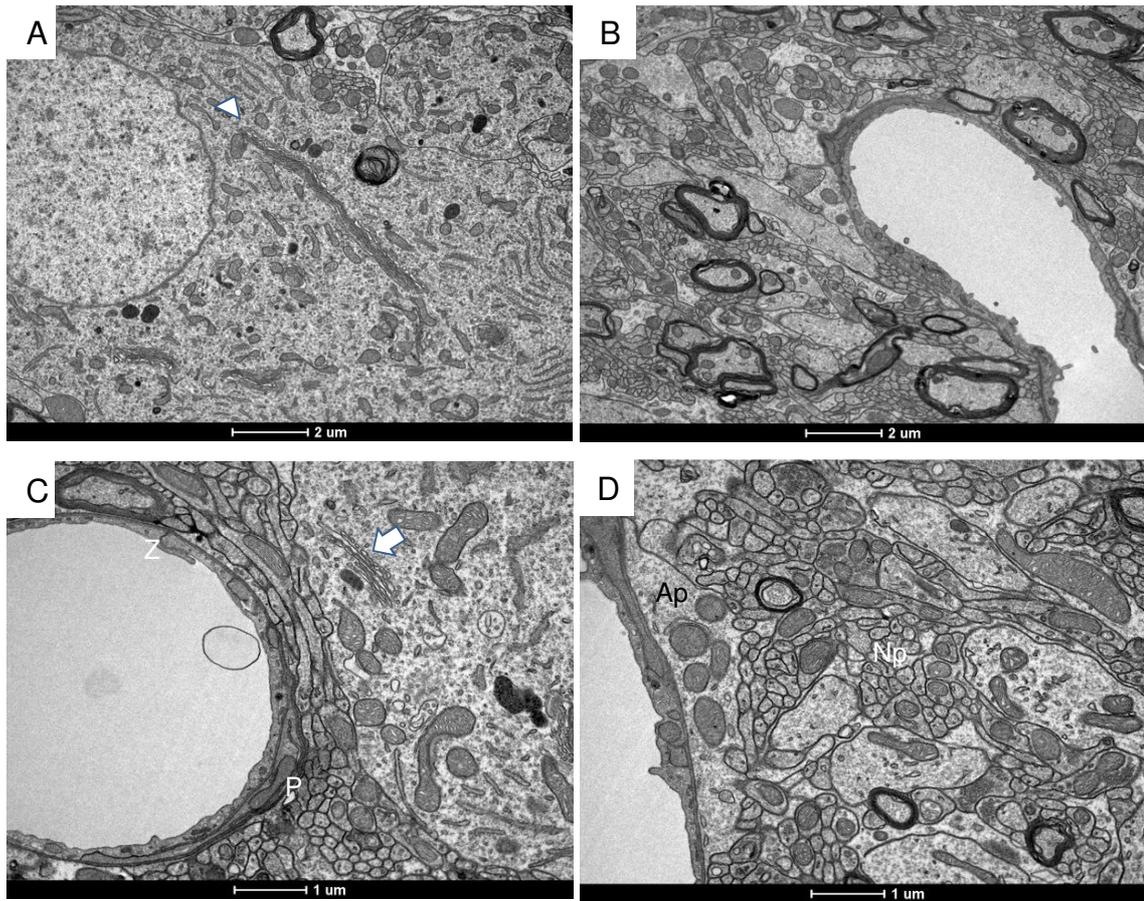


**Figura 42: Tempo de grooming de animais sedentários ou exercitados submetidos ou não à infusão de MPTP.** Comparação entre os tempos SS:  $p=0,4$ ; ES:  $p=0,6$ ; SM:  $p=0,1$ ; EM:  $p=0,8$ . Comparação entre os grupos:  $p>0,05$ .  $n=6-9$ .

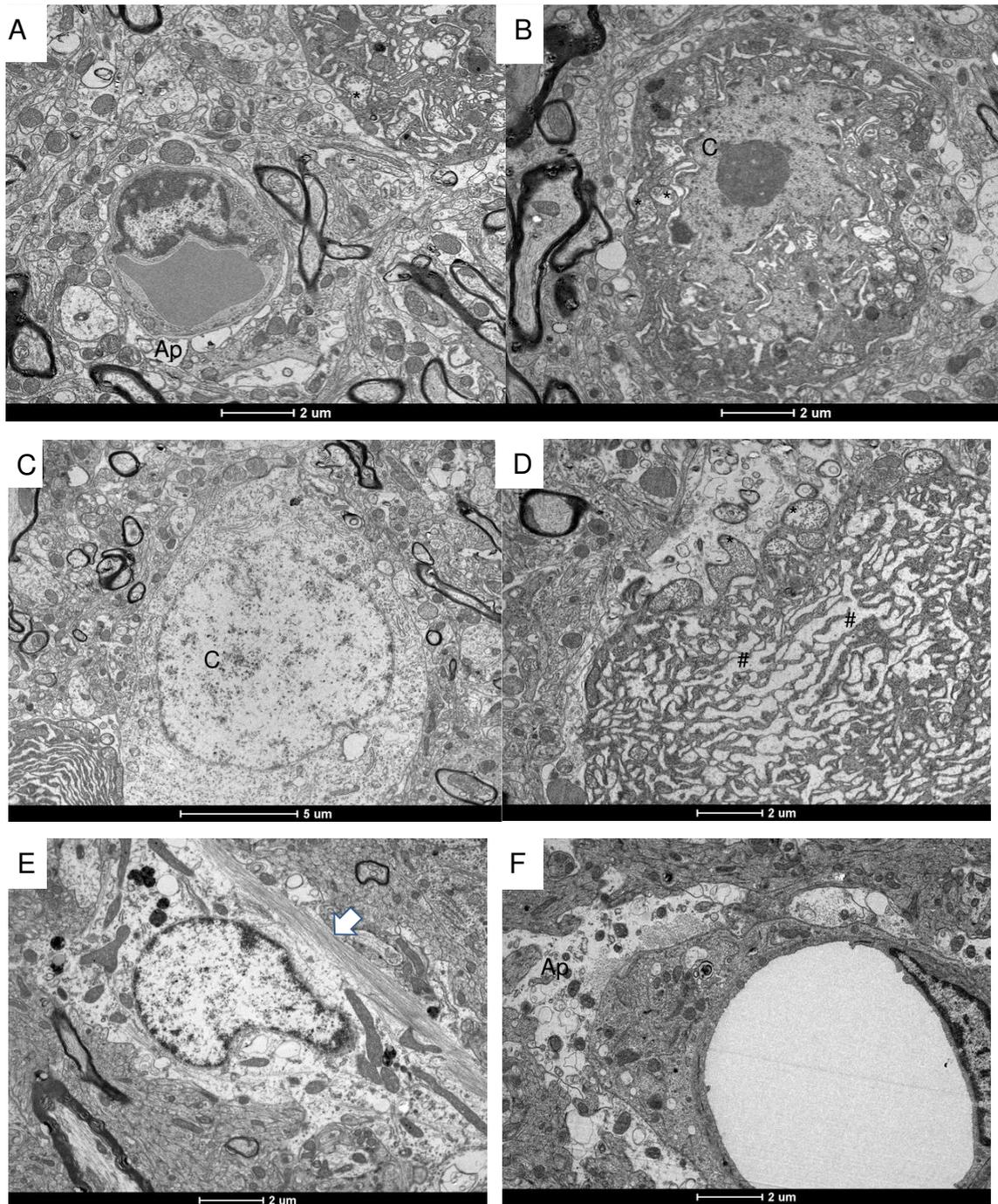
#### **4.7 Efeitos da infusão intranasal de MPTP sobre neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral**

A análise ultraestrutural do mesencéfalo ventral foi realizada apenas nos grupos de animais sedentários, submetidos ou não à infusão de MPTP, com o objetivo de verificar a ocorrência de degeneração neuronal. Os resultados mostraram alterações aos 42 dias pós-infusão de MPTP (Fig. 43 e 44). A região do mesencéfalo ventral de animais submetidos à infusão de salina apresentou neurônios com aspecto característico, em especial corpúsculos de Nissl e complexo de Golgi evidentes (Fig. 43A) e nucléolo proeminente. Observaram-se, no complexo gliovascular, capilares contínuos com zônulas de oclusão, citoplasma de pericitos e pés terminais de astrócitos (Fig. 43B e C). A neurópila mostrou-se bem preservada com prolongamentos de diferentes diâmetros (fig. 43D).

Já nos animais tratados com MPTP, observaram-se sinais de degeneração de neurônios, tais como dilatação do envelope nuclear e de retículo endoplasmático, vacuolização e aumento da densidade citoplasmática (Fig. 44B e D), desagregação de cristas mitocondriais, desfragmentação de complexo de Golgi e do retículo endoplasmático. Em alguns neurônios, o processo de degeneração parecia estar em fase inicial (Fig. 44C), em outros, em fase adiantada (Fig. 44B e D), confluindo para a formação de grandes estruturas disformes e densas. Com relação aos astrócitos, observaram-se vacúolos citoplasmáticos aumento de filamentos citoplasmáticos, provavelmente intermediários, e dilatação de pés terminais no complexo gliovascular (fig. 44E e F). Não se observou alteração nas células endoteliais.



**Figura 43: Ultraestrutura de mesencéfalo ventral de animais sedentários aos 4 dias após infusão de salina.** Imagens representativas de neurônio (A e C), neurópila e complexo gliovascular (B,C e D). Seta: Golgi; cabeça de seta: retículo endoplasmático granular; Z: zônula de oclusão em endotélio; \*: pericito; Ap: pé terminal de astrócito; Np: neurópila.



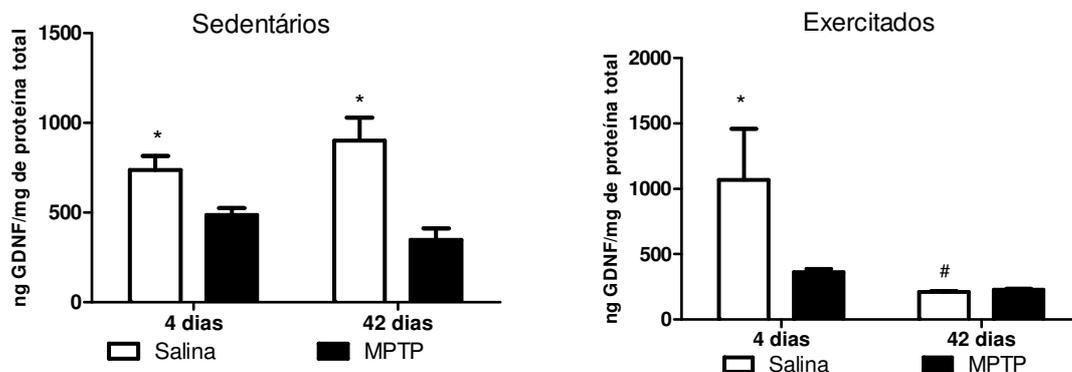
**Figura 44: Ultraestrutura de mesencéfalo ventral de animais sedentários aos 42 dias após infusão de MPTP.** Imagens representativas de complexo gliovascular (A e E), neurônio em degeneração (B,C e D) e astrócitos e seus prolongamentos (E e F). Seta: acúmulo de filamentos intermediários em astrócito; Ap: pé terminal de astrócito dilatado; #: cisternas dilatas em citoplasma neuronal; C: desagregação de cromatina em neurônio; \*: mitocôndrias alteradas.

## 4.8 Níveis de fatores neurotróficos no sistema nigroestriatal

Os níveis dos fatores neurotróficos GDNF e BDNF no mesencéfalo ventral e estriado foram avaliados em dois pontos do período experimental, aos 4 e aos 42 dias após infusão intranasal de MPTP e seus respectivos controles e comparados pelo teste *two-way ANOVA* e *post-hoc Bonferroni*.

### 4.8.1 Níveis de GDNF

Os grupos de animais exercitados e sedentários submetidos à infusão intranasal de MPTP (SM4:  $485 \pm 88$  ng/mg; EM4:  $365 \pm 51$  ng/mg), apresentaram decréscimo de GDNF aos 4 dias pós-infusão quando comparados aos seus controles salina (SS4:  $736 \pm 175$  ng/mg; ES4:  $1.069 \pm 868$  ng/mg). Esses dados mostram que exclusivamente a infusão intranasal de MPTP altera, em curto prazo, os níveis estriatais de GDNF e que o treinamento físico em esteira não impede essa queda (efeito do tratamento: sedentários:  $F_{32,17} = 54,55$ ;  $p = 0,0005$ ; exercitados:  $F_{6,35} = 22,49$ ;  $p = 0,03$ ).



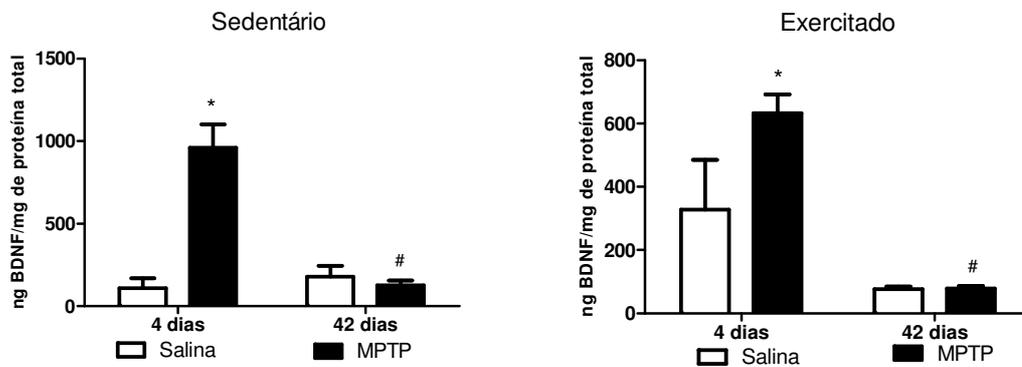
**Figura 45: Níveis de GDNF em estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.** Sedentário: \* $p < 0,0001$ ; (SS4 x SM4; SS42 x SM42). Exercitado: \* $p < 0,05$ ; (ES4 x EM4; ES42 x EM42); # $p < 0,05$ ; (ES4 x ES42).  $n = 5$ .

### 4.8.2 Níveis de BDNF

Aos 4 dias, os animais sedentários e exercitados salina exibiram níveis estriatais de BDNF (SS4:  $108 \pm 124$  ng/mg; ES4:  $324 \pm 273$  ng/mg) menores que os animais sedentários submetidos à infusão intranasal de MPTP (SM4:  $911 \pm 267$  ng/mg; EM4:

633 ± 117 ng/mg) (efeito do tratamento: sedentários:  $F_{26,76} = 26,12$ ;  $p = 0,002$ ; exercitados:  $F_{24,64} = 24,64$ ;  $p = 0,002$ ). Esse resultado sugere que a infusão de MPTP eleva os níveis de BDNF no estriado, no início do período experimental.

Os níveis estriatais de BDNF nos animais submetidos à infusão de MPTP, sejam sedentários ou exercitados, declinaram ao longo do período experimental, mostrando-se menores aos 42 dias (SM42: 123 ± 53 ng/mg; EM42: 77 ± 15 ng/mg;) que aos 4 dias (SM4: 911 ± 267 ng/mg; EM4: 633 ± 118 ng/mg;) (efeito do tempo: Sedentário:  $F_{17,63} = 24,41$ ;  $p = 0,005$ ; Exercitado:  $F_{24,64} = 55,20$ ;  $p = 0,002$ ). Ao final do período experimental, todos os grupos apresentaram valores semelhantes de BDNF no estriado.



**Figura 46: Níveis de BDNF no estriado em ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.** Sedentário: \* $p < 0,001$ ; (SS4 x SM4); # $p < 0,01$ ; (SM4 x SM42). Exercitado: \* $p < 0,05$ ; (ES4 x EM4); # $p < 0,01$ ; (EM4 x EM42).  $n = 4-5$

Em relação ao mesencéfalo ventral, aos 4 dias e 42 dias, os grupos de animais submetidos à infusão intranasal de MPTP, exercitados e sedentários (SM4: 9 ± 5 ng/mg; EM4: 41 ± 45 ng/mg; SM42: 36 ± 41 ng/mg; EM42: 53 ± 53 ng/mg), apresentaram níveis semelhantes de BDNF aos dos respectivos grupos salina (SS4: 8 ± 7 ng/mg; ES4: 63 ± 40 ng/mg; SS42: 19 ± 15 ng/mg, ES42: 80 ± 76 ng/mg). Também não foi encontrada diferença quando comparados os grupos nos dois períodos avaliados.

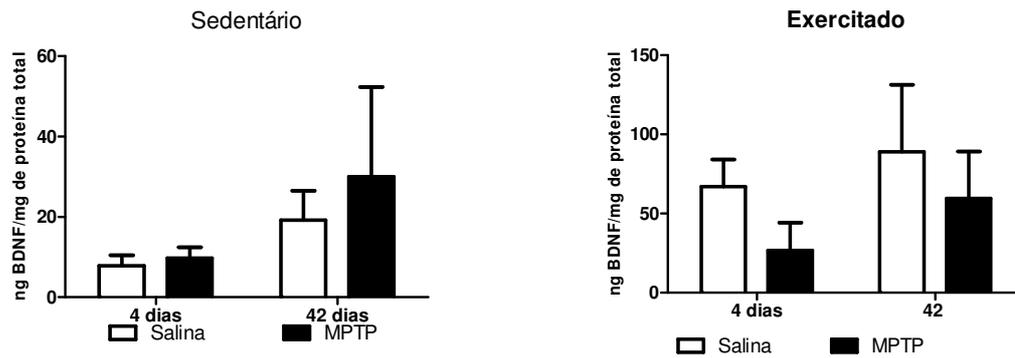


Figura 47: Níveis de BDNF em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.  $p > 0,05$ .  $n = 3-5$ .

## 4.9 Níveis de citocinas no sistema nigroestriatal

### 4.9.1 Níveis de TNF- $\alpha$

Aos 4 e 42 dias, todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de TNF- $\alpha$  em estriado (SM4:  $578 \pm 169$  ng/mg; ES4:  $271 \pm 22$  ng/mg; EM4:  $331 \pm 79$  ng/mg; SM42:  $603 \pm 300$  ng/mg; ES42:  $344 \pm 74$  ng/mg; EM42:  $411 \pm 213$  ng/mg), excetuando o grupo SS42 (SS4:  $640 \pm 209$  ng/mg; SS42:  $1107 \pm 399$  ng/mg) (efeito do tempo:  $F_{20,98} = 22,04$ ;  $p = 0,003$ ). Logo, o MPTP parece não ter interferido nos níveis estriatais de TNF- $\alpha$  nos períodos avaliados.

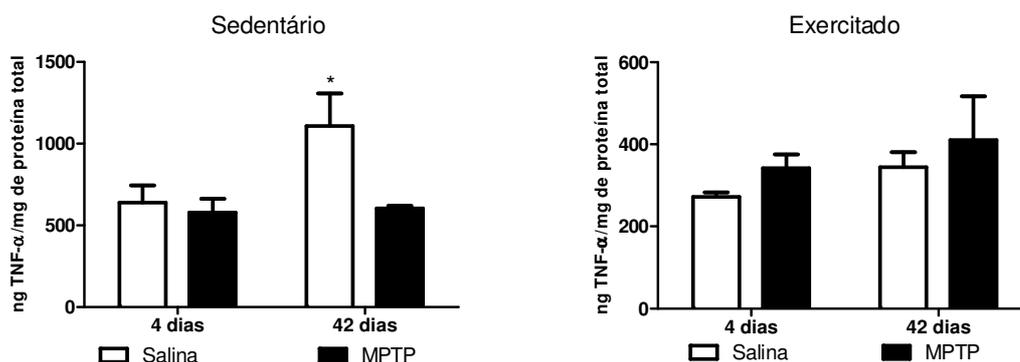
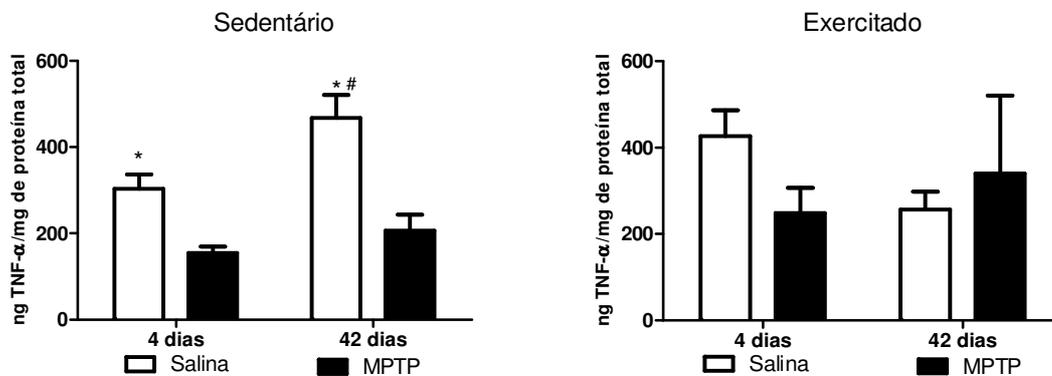


Figura 48: Níveis de TNF- $\alpha$  no estriado em ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina. Sedentário:  $*p < 0,05$  (SS42 x SM42). Exercitado:  $p > 0,05$ .  $n = 3-5$ .

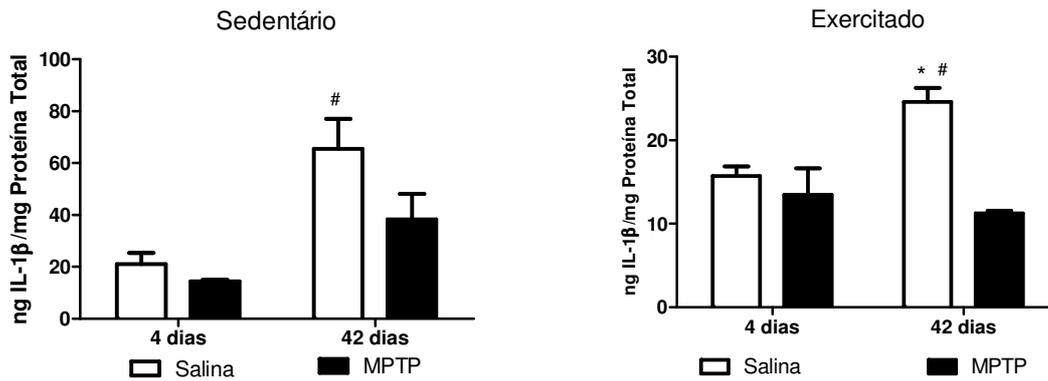
Em relação ao mesencéfalo ventral, aos 4 e 42 dias, os animais sedentários submetidos à infusão de MPTP (SM4:  $155 \pm 29$  ng/mg; SM42:  $192 \pm 84$  ng/mg) apresentaram níveis menores de TNF- $\alpha$  quando comparados a seu controle salina (SS4:  $284 \pm 67$  ng/mg; SS42:  $468 \pm 106$  ng/mg) (efeito da interação do tratamento e do tempo:  $F_{29,63} = 57,15$ ;  $p = 0,001$ ). Além disso, o grupo sedentário salina aos 42 dias mostraram níveis elevados de TNF- $\alpha$  quando comparados ao mesmo grupo no 4º dia (efeito do tempo:  $F_{8,18} = 20,78$ ;  $p = 0,02$ ). Por sua vez, os níveis de TNF- $\alpha$  no grupo exercitado foram semelhantes aos 4 e 42 dias (ES4:  $305 \pm 190$  ng/mg; EM4:  $154 \pm 75$  ng/mg; ES42:  $256 \pm 84$  ng/mg; EM42:  $148 \pm 118$  ng/mg).



**Figura 49: Níveis de TNF- $\alpha$  em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.** Sedentário: \* $p < 0,05$  (SS4 x SM4; SS42 x SM42); # $p < 0,05$  (SS4 x SS42). Exercitado:  $p > 0,05$ .  $n = 3-5$ .

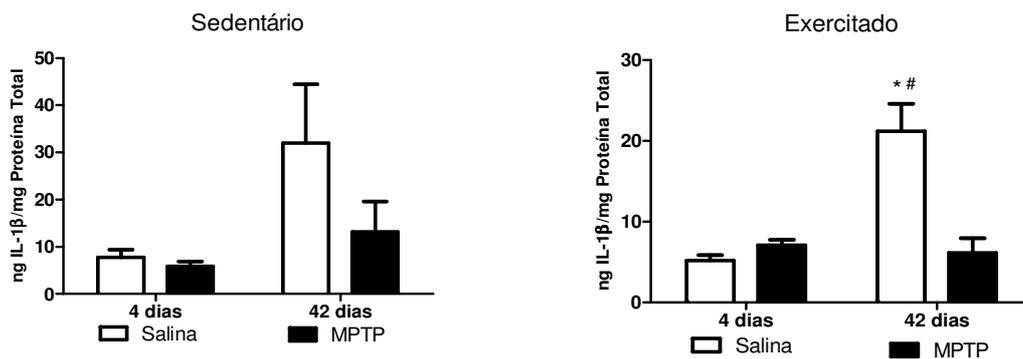
#### 4.9.2 Níveis de Interleucina 1 $\beta$

Aos 4 dias, todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de IL-1 $\beta$ . O grupo sedentário salina mostrou níveis elevados quando comparado 4 aos 42 dias (SS4:  $19 \pm 9$  ng/ml, SS42:  $66 \pm 23$  ng/ml) (efeito do tempo:  $F_{28,51} = 50,28$ ;  $p = 0,0018$ ). Aos 42 dias, o grupo exercitado salina apresentou níveis de IL-1 $\beta$  maiores que o mesmo grupo aos 4 dias (ES42:  $24 \pm 4$  ng/mg; ES4:  $16 \pm 2$  ng/ml) (efeito do tempo:  $F_{4,2} = 41,75$ ;  $p = 0,01$ ) e também que o grupo exercitado MPTP aos 42 dias (EM42:  $11 \pm 3$  ng/mg) (efeito da interação tempo e tratamento:  $F_{21,48} = 41,75$ ;  $p = 0,003$ ).



**Figura 50: Níveis de IL-1 $\beta$  no estriado em ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.** Sedentário: <sup>#</sup>p<0,01; (SS4 x SS42). Exercitado: <sup>\*</sup>p<0,001 (ES42 x EM42); <sup>#</sup>p<0,05 (ES4 x ES42). n=4-5.

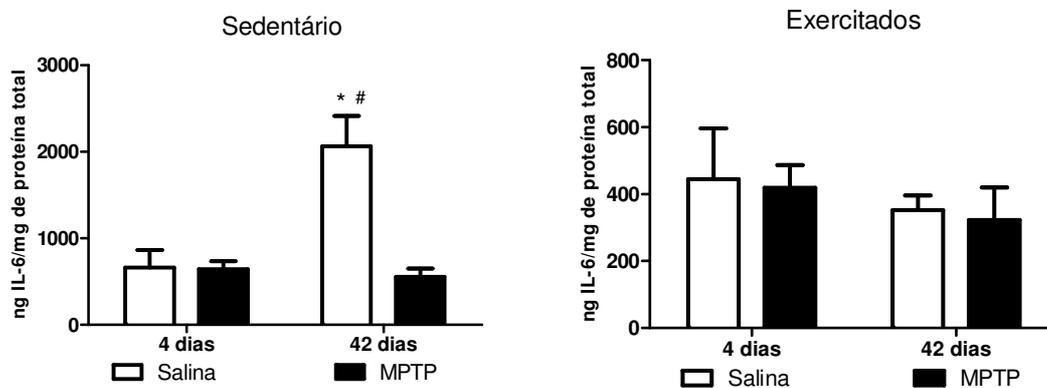
Em relação ao mesencéfalo ventral, não foi observado diferenças entre os grupos sedentários em qualquer dos períodos experimentais avaliados. No grupo exercitado, os animais salina aos 42 dias apresentaram níveis maiores de IL-1 $\beta$  do que o mesmo grupo aos 4 dias (ES4: 5  $\pm$  1 ng/mg; ES42: 21  $\pm$  7 ng/mg) (efeito da interação tempo e tratamento:  $F_{17,66} = 26,01$ ;  $p = 0,005$ ) e também do grupo MPTP aos 42 dias (EM42: 6  $\pm$  3 ng/mg) (efeito da interação tempo e tratamento:  $F_{32,73} = 32,73$ ;  $p = 0,003$ ). Indicando que possa haver uma modulação dos níveis desta citocina pelo treinamento físico.



**Figura 51: Níveis de IL-1 $\beta$  em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.** Sedentário:  $p > 0,05$ . Exercitado: <sup>#</sup>p<0,01; (ES4 x ES42); <sup>\*</sup>p<0,001 (ES4 x ES42). n=3-4.

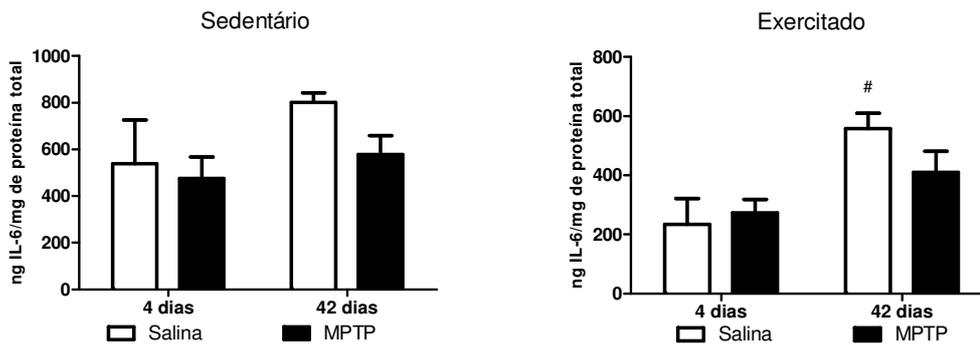
### 4.9.3 Níveis de Interleucina 6

Aos 4 dias, todos os grupos apresentam níveis semelhantes de IL-6 no estriado (SS4:  $640 \pm 353$  ng/mg; SM4:  $643 \pm 181$  ng/mg; ES4:  $444 \pm 304$  ng/mg; EM4:  $419 \pm 136$  ng/mg). Aos 42 dias, o grupo sedentário salina (SS42:  $2064 \pm 705$  ng/mg) expressou níveis de IL-6 superiores ao do grupo sedentário MPTP (SM42:  $553 \pm 198$  ng/mg) e também maiores que SS4 (efeito da interação tempo e tratamento:  $F_{10,35} = 27,57$ ;  $p = 0,01$ ). Os animais exercitados apresentaram níveis semelhantes aos 42 dias (ES42:  $353 \pm 88$  ng/mg; EM42:  $323 \pm 195$  ng/mg). Os resultados mostram que a infusão intranasal de MPTP parece não alterar os níveis de IL-6 de forma aguda ou crônica.



**Figura 52: Níveis de IL-6 no estriado em ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.** Sedentários: \* $p < 0,01$ ; (SS42 x SM42); # $p < 0,01$ ; (SS4 x SS42). Exercitados:  $p > 0,05$ .  $n = 4-5$ .

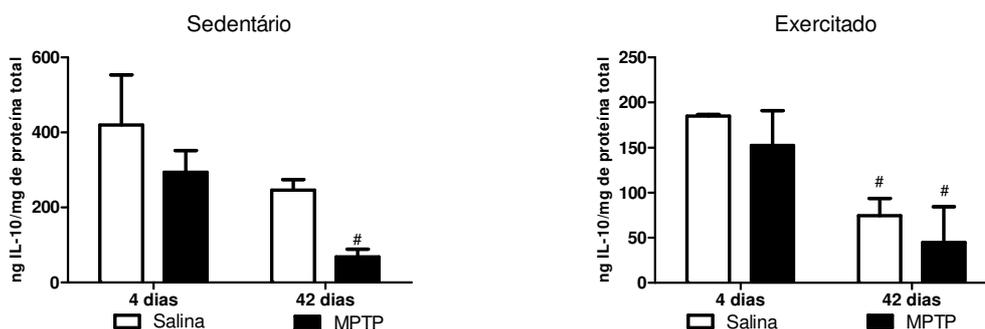
Aos 4 e aos 42 dias, todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de IL-6 no mesencéfalo ventral. Somente o grupo ES apresentou elevação dos níveis de IL-6 entre os períodos experimentais (ES4:  $234 \pm 175$  ng/mg; ES42:  $557 \pm 105$  ng/mg), sugerindo uma modulação dos níveis dessa citocina pelo treinamento físico (efeito do tempo:  $F_{9,18} = 45,24$ ;  $p = 0,02$ ).



**Figura 53: Níveis de IL-6 em mesencéfalo ventral de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.** Exercitado: <sup>#</sup> $p < 0,05$ ; (ES4 x ES42).  $n=4-5$ .

#### 4.9.4 Níveis de Interleucina 10

Aos 4 dias, o MPTP parece não ter efeito sobre níveis de IL-10 pois os animais que receberam a infusão de MPTP (EM4 e SM4) não distinguiram-se de seus controles (ES4 e SS4). Aos 42 dias todos os grupos, exceto o sedentário salina, apresentaram níveis menores do que aos 4 dias (SM4:  $294 \pm 129$  ng/ml; SM42:  $66 \pm 45$  ng/ml) (efeito do tempo:  $F_{9,74} = 26,05$ ;  $p=0,01$ ), (EM4:  $152 \pm 39$  ng/ml; EM42:  $90 \pm 12$  ng/ml; ES4:  $185 \pm 19$  ng/ml; ES42:  $75 \pm 19$  ng/ml) (efeito do tempo:  $F_{76,32} = 76,99$ ;  $p=0,0001$ ).



**Figura 54: Níveis de IL-10 no estriado de ratos exercitados e sedentários aos 4 e 42 dias após infusão intranasal de MPTP ou salina.** Sedentário: <sup>#</sup> $p < 0,05$ ; (SM4 x SM42). Exercitado: <sup>#</sup> $p < 0,01$ ; (ES4 x ES42, EM4 x EM42).  $n=4-5$ .

## **5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

## 5 Discussão e Conclusão

### 5.1 Treinamento físico em esteira e alterações comportamentais

Buscou-se, neste trabalho, avaliar os efeitos do treinamento físico em esteira sobre o desempenho motor e comportamento em campo aberto de ratos jovens. Os resultados do presente estudo mostraram que o treinamento físico em esteira pelo período de 30 dias, - em sessões diárias de 30 min, frequência de 7 vezes/semana e intensidade moderada - melhorou a aptidão física dos animais, mensurada pelos parâmetros de velocidade máxima alcançada, velocidade média desenvolvida e distância percorrida. O período e o volume de exercício (minutos/semana) utilizados neste trabalho já se mostraram efetivos em melhorar a aptidão física dos animais treinados, em estudo de Al-Jarrah *et al.* (2007), traduzida em diminuição da frequência cardíaca de repouso, diminuição do consumo de oxigênio e produção de CO<sub>2</sub>, aumento da massa de ventrículo esquerdo e aumento da enzima citrato sintase muscular.

Neste estudo a avaliação do desempenho aeróbico submáximo revelou uma grande variação entre as velocidades alcançadas (11 a 36 m.min<sup>-1</sup>), indicando a existência de animais com aptidões físicas tão diversas que não seria possível agrupá-los sob única velocidade. Essa variação de capacidade aeróbica entre roedores já foi identificada por Henderson *et al.* (2002), que a consideram como uma interação de fatores genéticos pré-existentes, fatores genéticos de resposta adaptativa e fatores ambientais. Sendo assim, alterações genéticas e/ou ambientais influenciam a capacidade aeróbica do animal. Logo, mostrou-se conveniente avaliar a capacidade aeróbica de cada animal e o método de avaliação de desempenho adotado neste trabalho adequou a intensidade do exercício à aptidão física do animal. A avaliação de desempenho aeróbico submáximo é interessante por adequar a carga do treinamento à aptidão física intrínseca, além de garantir a constância da intensidade do esforço por todo período de treinamento (ACSM, 2003). Os testes de aptidão física têm como objetivo conhecimento da situação basal do indivíduo, acompanhamento da evolução, adequação da atividade, estabelecimento de metas e estratificação do risco à saúde. A aptidão física é mensurada através do *endurance* cardiorrespiratório, *endurance* e força muscular, composição corporal e

flexibilidade (ACSM, 2003). Já em modelos de exercício aeróbico em animais, a prática de realizar testes de aptidão física para conhecimento da capacidade aeróbica é corrente (Koch *et al.*, 2011; Minami *et al.*, 2007; Henderson *et al.*, 2002), bem como a de seleção de um grupo exercitado homogêneo de acordo com a velocidade imposta (Rachetti *et al.*, 2013; Lau *et al.*, 2011; Pothakos *et al.*, 2009; Aguiar *et al.*, 2009 e 2007; Al-Jarrah *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2004). Porém, não há, necessariamente, a preocupação em correlacionar o teste de estratificação de capacidade aeróbica com a intensidade do exercício realizado. A importância dessa correlação tem sido discutida recentemente por pesquisadores da UFRS (Nascimento *et al.*, 2011; Senna *et al.*, 2011; Mello *et al.*, 2008), USP (Rodrigues *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2003) e UFMG (Balthazar *et al.*, 2010 e 2009; Leite *et al.*, 2009).

Cabe ressaltar a importância da reavaliação de desempenho aeróbico para manutenção de intensidade do treinamento proporcional à modificação da aptidão física do animal. Neste estudo, a reavaliação no 15º dia de treinamento em esteira mostrou-se necessária para adequar o ritmo de progressão ao estágio inicial de condicionamento destes animais. Já foi observado mudança na velocidade desenvolvida por camundongos treinados em esteira a partir do 12º dia de treinamento, refletida em aumento da velocidade média e distância percorrida, além de mudança na capacidade aeróbica do animal (Fisher *et al.* 2004). A relevância da manutenção da intensidade é suportada pela melhora de parâmetros físicos ser proporcional à intensidade do exercício (Kemi *et al.*, 2005) e também pelo fato de exercício em esteira de baixa intensidade não alterar parâmetros físicos, emocionais ou de locomoção (Cordova *et al.*, 2013). É interessante notar a proposição de Koch *et al.* (2011) que correlaciona capacidade aeróbica e longevidade em ratos, observação já relatada em humanos (Blair *et al.*, 1989).

Sob a óptica de alteração de comportamento, e sob nosso conhecimento, alguns dos resultados obtidos no teste de campo aberto são inéditos, no que se refere aos parâmetros de velocidade máxima, tempo de *rearing*, tempo de *grooming*, latência para realização do primeiro *rearing* e do primeiro *grooming*. Os animais treinados comparados aos sedentários apresentaram melhor desempenho em número de quadrantes cruzados, velocidade média, número e tempo de *rearing*. Estes

resultados indicam que o treinamento físico influencia a curiosidade exploratória em roedores.

É sabido que o treinamento aeróbico altera o metabolismo energético do músculo esquelético (aumenta estoques de glicogênio, acelera a cinética do lactato e aumenta a densidade mitocondrial), aumenta o número proporcional de fibras musculares tipo I (chamadas fibras de contração lenta relacionadas à resistência muscular), aumenta a densidade de capilares (Coffey & Hawley, 2007) e gera um remodelamento da junção neuromuscular (Deschenes *et al.*, 2011). Além disso, a corrida de ratos em plano inclinado aumenta o custo metabólico da atividade e implica em maior participação de musculatura extensora em contração concêntrica (Armstrong & Taylor, 1993). Assim, o indivíduo apresenta melhora no controle motor, nas potência e resistência musculares, traduzidas nos animais do presente estudo por aumento da velocidade média e número de quadrantes cruzados.

A análise do número e tempo de *rearing* também se relaciona com aquelas alterações músculo esqueléticas e também tangencia a postura e o padrão de marcha de pequenos mamíferos terrestres, como os roedores. O padrão de marcha desses mamíferos é chamado de comportamento pantográfico, em que ocorrem movimentos conjuntos da articulação tarso-metatarsica com membro posterior e da escápula com membro anterior contralateral, e conseqüente movimento rotacional da coluna vertebral no plano sagital (Fischer *et al.*, 2002). Assim, a corrida em esteira num plano inclinado favorece o fortalecimento da musculatura do tronco, musculatura primariamente relacionada a suporte de peso e manutenção da postura, mas secundariamente trabalhada pela característica diagonal da marcha de roedores e pela maior solicitação da atuação de membros anteriores no plano inclinado. O único estudo que percebeu aumento do número de *rearings*, semelhante ao encontrado neste estudo, é o de Fulk *et al.* (2004). Cabe ressaltar que o treinamento físico desse trabalho, assim como o do presente estudo, foi realizado com inclinação da esteira em 5°, os demais artigos não utilizaram inclinação na esteira (Cordova *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2011; Aguiar *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2008; Dishman *et al.*, 1997 e 1988). Sendo assim, realizar o exercício físico em esteira inclinada provavelmente favorece o fortalecimento da musculatura do tronco de roedores e altera seu comportamento de exploração vertical.

Os estudos que relacionam o exercício de ratos em esteira com o teste de campo aberto não viram alteração nos parâmetros avaliados (Cordova *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2011; Aguiar *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2008; Burghardt *et al.*, 2004; Dishman *et al.*, 1997 e 1988). Isto pode ser explicado pela diversidade de protocolos de corrida adotados, da idade dos animais utilizados, do período de exercício se iniciar após intervenção lesiva, das comparações experimentais entre grupos não contemplarem o grupo controle e o grupo exclusivamente exercitado - quase não há este grupo nos delineamentos experimentais vistos -, da técnica utilizada para realização do teste de campo aberto e da impossibilidade de avaliar tantos parâmetros devido ao recente advento do *software* de análise (o próprio fabricante acusa artigos a partir de 2006).

No acompanhamento longitudinal dos animais exercitados por até 41 dias após o término do treinamento físico ainda perceberam-se seus efeitos sobre atividade locomotora exploratória. Quando comparados animais exercitados e sedentários (ES x SS) de mesma idade, houve aumento no parâmetro número de *rearings* até 21 dias e aumento nos parâmetros de distância percorrida e velocidade máxima alcançada até 41 dias após o término do treinamento. Isto pode indicar que o treinamento em esteira atua e altera de formas diferentes e por tempos diferentes a musculatura de tronco e de membros em roedores. Ressalta-se que não foi encontrado, na literatura, acompanhamento longitudinal (*follow-up*) após término do período de treinamento físico que contemplasse análise de comportamento em roedores.

## **5.2 Influência do treinamento físico sobre os níveis de fatores neurotróficos**

Os resultados do presente estudo apontam que o treinamento aeróbico, nos parâmetros executados, não elevou os níveis estriatais de GDNF, mensurado 4 dias após o seu término. Os níveis de GDNF em mesencéfalo ventral não foram mensurados. Este dado não é confirmado pela literatura que encontrou aumento do nível estriatal de GDNF em regime crônico de 18 semanas de treinamento em esteira (Lau *et al.* 2011), regimes de exercício em esteira de 4 semanas de baixa intensidade (Tajiri *et al.*, 2010) ou utilizando exercício voluntário (Zigmond *et al.*, 2009; Faherty *et al.*, 2005). Quando comparou-se os grupos nos dois períodos

experimentais (4 e 42 dias), os animais exercitados salina apresentaram decréscimo do nível estriatal de GDNF, não observado nos sedentários salina. Isso levanta a questão de que exista uma sujeição da síntese e metabolismo de GDNF à execução contínua do exercício físico. Zigmond *et al.* (2012 e 2009) discutem a hipótese que o aumento de fatores neurotróficos em animais exercitados ocorre pelo “médio estresse celular” gerado pelo próprio exercício. Os dados apresentados sugerem que o aumento e manutenção dos níveis de GDNF dependem da constância de execução do exercício, da modalidade escolhida e do período de exercício aeróbico realizado.

Sobre os níveis de BDNF em resposta ao treinamento físico, os resultados do presente estudo demonstraram aumento do nível de BDNF em mesencéfalo ventral e não em estriado, aos 4 e aos 42 dias. Lau *et al.* (2011) e van Hoomissen *et al.* (2003) também observaram aumento em mesencéfalo ventral do nível de BDNF em resposta ao treinamento crônico e agudo, respectivamente. Assim como os resultados do presente estudo, Windenfalk *et al.* (1999) não observaram declínio dos níveis de BDNF em médio prazo, após término do treinamento físico. Deste modo, conclui-se que o treinamento aeróbico nos parâmetros realizados eleva e mantém os níveis de BDNF em mesencéfalo ventral. O BDNF é crítico para sobrevivência de neurônios dopaminérgicos e para proteção destes neurônios mediante injúria neurotóxica por MPTP (Gerecke *et al.*, 2012). Também são atribuídos ao BDNF os efeitos benéficos do exercício físico em longo prazo (Cotman & Bertchold, 2002).

### **5.3 Influência do treinamento físico sobre os níveis de citocinas**

O presente estudo investigou os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 em resposta ao treinamento físico em esteira e à infusão de MPTP.

Com relação ao treinamento físico, os resultados deste estudo apontam decréscimo dos níveis estriatais IL-10 aos 4 e 42 dias, de TNF- $\alpha$  aos 4 e 42 dias e de IL-1 $\beta$  e IL-6 aos 42 dias.

Os achados da literatura são diversos. Na literatura está relatado tanto diminuição dos níveis de IL-10 no núcleo paraventricular (Agarwal *et al.* 2011) como ao aumento dos níveis de IL-10 em córtex cerebral (Mota *et al.*, 2012) de ratos em resposta ao

exercício moderado em esteira. Já com relação ao TNF- $\alpha$  foi encontrado acentuado decréscimo de TNF- $\alpha$  em hipocampo de camundongos em resposta ao exercício voluntário (Pervaiz e Hoffman-Goetz, 2011), mas outros estudos não observaram alteração desta citocina (Mota *et al.*, 2012; Agarwal *et al.* 2011; Nichol *et al.*, 2008; Colbert *et al.*, 2001). Os níveis de IL-6 apresentaram aumento em hipocampo de camundongos em resposta ao exercício voluntário (Pervaiz e Hoffman-Goetz, 2011) e outros estudos não observaram alteração (Mota *et al.*, 2012; Chennaoui *et al.*, 2008; Colbert *et al.*, 2001). Um estudo encontrou diminuição de IL-1 $\beta$  hipocampo (Chennaoui *et al.*, 2008), outros não perceberam diferença em núcleo paraventricular (Agarwal *et al.*, 2011), no córtex cerebral (Mota *et al.*, 2012, Colbert *et al.*, 2001) e no próprio hipocampo (Nichol *et al.*, 2008). Apesar da diversidade de dados encontrada, os resultados do presente estudo estão corroborados pela literatura.

Comparando os períodos experimentais de 4 dias com 42 dias no grupo sedentário submetido à salina (ES), foi observado aumento dos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , além da diminuição de IL-10 em estriado. Isto pode indicar um efeito moderador do treinamento físico sobre níveis destas citocinas mesmo com a cessação de sua execução. Agarwal *et al.* (2012) não observaram alteração de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no núcleo paraventricular de ratos após 14 dias de descondicionamento físico. Porém, observaram, como no presente estudo, decréscimo dos níveis IL-10, reforçando que a prática regular de exercício físico aeróbico é importante para manutenção do equilíbrio entre citocinas anti e pró-inflamatórias (Agarwal *et al.*, 2012). Lovatel *et al.* (2013) avaliaram o efeito do exercício físico em esteira por duas semanas comparando ratos de 3 meses a ratos de 20 meses através dos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, NF-kb e acetilação da histona H4. Os autores defendem a hipótese de que o envelhecimento aumenta a transcrição de NF-kb que modula a acetilação de histonas H4, que conjuntamente, aumentam a expressão daquelas citocinas. Como resultado, obtiveram que o exercício físico modula as citocinas do hipocampo de rato jovem e reverte o aumento seus níveis em ratos idosos. Em humanos, Ratel *et al.* (2010) observaram reversão dos benefícios musculares e metabólicos alcançados pela prática de exercício físico em indivíduos treinados por 16 semanas e observados por mais 8 semanas na ausência do exercício.

#### **5.4 Modelo experimental de indução de parkinsonismo por infusão intranasal de MPTP**

No presente estudo foi constatada morte neuronal, por microscopia eletrônica de transmissão, em mesencéfalo ventral de ratos sedentários submetidos à MPTP aos 42 dias pós-infusão. Observou-se condensação periférica da cromatina, dilatação do envelope nuclear e retículo endoplasmático, vacuolização e aumento da densidade citoplasmática, desagregação de cristas mitocondriais e desfragmentação retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Com relação aos astrócitos, foi observado vacúolos citoplasmáticos, aumento de filamentos citoplasmáticos, e dilatação de pés terminais. Em outros estudos que utilizaram MPTP tanto *in vivo* quanto *in vitro* foram observadas alterações celulares semelhantes aos encontrados no presente estudo. Serra *et al.* (2002) observaram condensação de cromatina e feições apoptóticas em neurônio dopaminérgico e glia da SNpc a partir do sexto dia pós tratamento crônico intraperitoneal com MPTP em camundongos. Song *et al.* (2004) observaram mitocôndrias esféricas edemaciadas com perda de cristas na SN de camundongos com 11 semanas de idade e que expressam altos níveis de  $\alpha$ -sinucleína, tratados com 4 doses intraperitoneais de MPTP. Bando *et al.* (2005) observaram em cultura de células dopaminérgicas tratadas com MPP<sup>+</sup> edema de retículo endoplasmático rugoso aumento do número de ribossomos livres e perda de crista mitocondrial. Dessa forma, pode-se concluir que o MPTP por infusão intranasal gera alterações ultraestruturais e morte de neurônio dopaminérgico semelhantes à de outras formas de administração *in vivo* e também tratamento *in vitro*.

Além da caracterização histológica e neuroquímica, o grupo de Rui Prediger realizou diversos testes comportamentais avaliando discriminação olfatória, reconhecimento social, memória de trabalho, de processo e de referência, comportamento depressivo e atividade locomotora espontânea. Observaram diminuição da discriminação olfatória aos 7 dias pós-infusão com reversão aos 21 dias pós-infusão, maior tempo de exploração para reconhecimento social aos 7 dias pós-infusão, alteração da memória de trabalho aos 12 dias pós-infusão, não observaram alterações nas memórias de processo e referência aos 12 dias pós-infusão, aumento do tempo de imobilidade em nado forçado indicando perfil depressivo aos 14 dias pós-infusão e diminuição da atividade locomotora em campo aberto e caixa de

atividade aos 21 e 32 dias pós infusão, respectivamente (Moreira *et al.*, 2010; Prediger *et al.*, 2009; Prediger *et al.*, 2006).

No presente estudo, analisou-se apenas a atividade locomotora espontânea em campo aberto, uma vez que está diretamente relacionada à outra vertente do estudo que é o treinamento físico em esteira. Em consonância com os achados anteriores (Moreira *et al.*, 2010; Prediger *et al.* 2006 e 2009), no presente estudo, o grupo sedentário submetido à infusão de MPTP obteve decréscimos do número de quadrantes cruzados e do número de *rearings* executados a partir de 21 dias pós-infusão, sendo significativo aos 31 dias. Também houve decréscimo do tempo de *rearing*, tempo ativo, velocidade máxima, distância percorrida, número de *groomings*, aumento do tempo de *freezing* e da latência para realização do primeiro *grooming*.

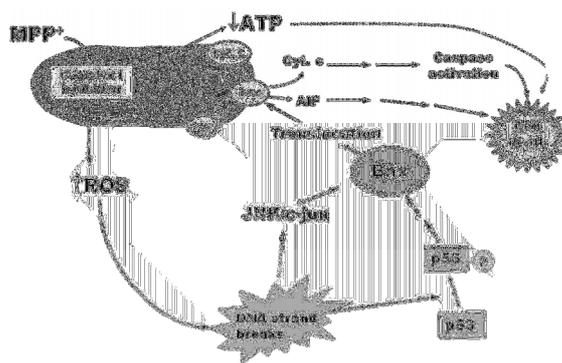
Já os animais exercitados submetidos à infusão de MPTP, no intervalo de tempo observado, não mostraram decréscimo de atividade locomotora exploratória em relação aos animais salina, mas sim elevação ao 31<sup>º</sup> dias pós-infusão. Isto denota que o MPTP pode interagir de forma diferente em animais treinados. Resultado semelhante foi observado por Smith *et al.* (2011) que perceberam aumento da atividade locomotora quando associa-se MPTP ao treinamento físico.

Referindo-se ao quadro não sintomático do grupo EM, discute-se a relação treinamento físico e estresse oxidativo. Sabe-se que o MPTP é uma proneurotoxina que perturba, por saturação, o complexo I mitocondrial em neurônios dopaminérgicos, o que inibe a síntese e leva à depleção de ATP intracelular, gerando ROS. Estes, por sua vez, ativam a transcrição de p53 e JNK, que causam a translocação de Bax para a membrana mitocondrial que promove a translocação de citocromo C e fator indutor de apoptose (AIF) para o citoplasma, sucedendo apoptose dependente de caspase (Przedborski *et al.*, 2004a) (Fig. 55).

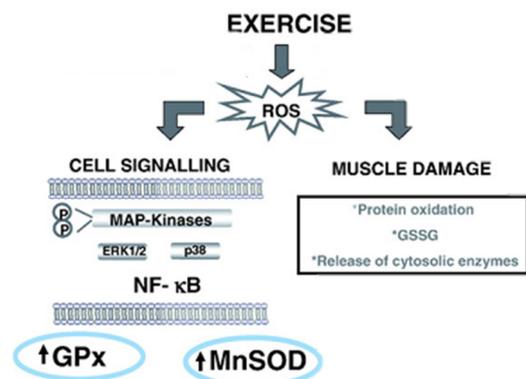
É sabido que o exercício físico (a contração muscular contínua) gera ROS que desencadeia adaptações musculares através do desenvolvimento de sistemas antioxidantes compensatórios em resposta a este estresse (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008) (Fig. 56). Em tecido cerebral, este fato é corroborado pelos achados de diminuição dos níveis de produtos de oxidação mitocondrial, aumento dos níveis das enzimas antioxidantes - Mn-SOD, Cu-Zn SOD, glutathiona peroxidase e catalase -,

biogênese mitocondrial e de componentes da cadeia respiratória, principalmente complexos I e IV (Boveris & Navarro, 2008). Sendo assim, o exercício aeróbico moderado aumenta a resistência ao estresse oxidativo, com efeito não circunscrito às adaptações neuromusculares (Radak *et al.*, 2001).

*Hormesis* é o conceito atual que rege a relação oxidante/antioxidante concernente a exercício aeróbico moderado. Reflete a existência de uma correspondência de dose-resposta a uma mesma substância/evento que, assim, pode apresentar efeitos deletérios ou benéficos (Calabrese & Baldwin, 2003). Sendo assim, os efeitos bloqueadores de complexo I mitocondrial gerado por MPTP podem estar subjugados aos sistemas compensatórios antioxidantes gerados pelo exercício físico moderado, seja pela biogênese mitocondrial e de componentes da cadeia respiratória complexo I ou pela superexpressão de enzimas antioxidantes. Em estudos em que a lesão por MPTP é simultânea ao exercício físico, foi observado recuperação e/ou melhora de sinais parkinsonianos (Lau *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2011; Gorton *et al.*, 2010; Ahmad *et al.*, 2009; Pothakos *et al.*, 2009; Al-Jarrah *et al.*, 2007; Petzinger *et al.*, 2007; Fisher *et al.*, 2004; Tillerson *et al.*, 2003). Lau *et al.* (2011) em modelo sistêmico crônico de administração de MPTP e exercício moderado em esteira por 18 semanas, observaram aumento do conteúdo estriatal de enzimas antioxidantes, melhora da taxa respiratória mitocondrial pela análise de complexos III e IV e aumento do nível de ATP mitocondrial.



**Figura 55: Representação esquemática da ação do MPTP sobre disfunção mitocondrial** acarretando geração de ROS e ativação da apoptose mediada por caspase no neurônio dopaminérgico. (retirado de Przedborski *et al.*, 2001).



**Figura 56: Representação esquemática da resposta celular ao exercício físico** sobre a geração de substâncias oxidantes e antioxidantes. (retirado de Gomes-Cabrera *et al.*, 2008).

O aumento da atividade locomotora do grupo de animais exercitados submetidos à infusão de MPTP (EM) aos 31 dias sugere que as alterações metabólicas/moleculares do treinamento físico interagem com as alterações geradas pelo MPTP. Já está apresentado na literatura que o exercício físico atua no estriado aumentando a densidade sináptica glutamatérgica, diminuindo a expressão de DAT e D1, (Fisher *et al.*, 2004), aumentando a expressão de D2 (Vuckovik *et al.*, 2010, MacRae *et al.*, 1974). Por sua vez, o MPTP, assim como a doença de Parkinson, diminui os níveis dopamina, e seus metabólitos (Petzinger *et al.*, 2007; Prediger *et al.*, 2006; Hornykiewicz, 2001), bem como eleva os níveis estriatais de serotonina, glutamato e GABA (Boulet *et al.*, 2008), diminui a expressão de DAT, D1 e D2.

Hipotetiza-se que o treinamento físico cause diminuição da expressão de DAT, o que leva a um aumento do tempo de disponibilidade de dopamina na fenda sináptica, que aumenta a expressão de D2 e diminui de D1 evitando uma hiperkinesia. Porém, por ação do MPTP, o nível de dopamina diminui com o tempo, assim há uma elevação compensatória de glutamato, serotonina e GABA – que se mantêm elevados até recuperação total da lesão por MPTP – mantendo o funcionamento do circuito responsável pela motricidade voluntária. Há, simultaneamente, hiperinervação serotoninérgica em estriado (Boulet *et al.*, 2008), que adjunta a elevação de receptores D2 gera discinesia, relação há muito conhecida em doença de Parkinson (Shin *et al.*, 2012).

O conjunto de dados da literatura apresentado, leva-nos a propor a hipótese de que, por volta de 30 dias, há uma congregação de efeitos compensatórios exacerbados e sobrepostos que levam há uma situação hiperkinética, não observada nos 10 dias prévios ou posteriores a esta data nos animais EM.

## **5.5 Influência da infusão de MPTP sobre os níveis de fatores neurotróficos**

Com o modelo utilizado de infusão intranasal de MPTP, não há qualquer estudo sobre níveis de fatores neurotróficos ou citocinas, tornando os resultados deste trabalho inéditos.

Em relação aos efeitos da infusão de MPTP, observou-se neste trabalho, que a droga em curto prazo diminuiu os níveis estriatais de GDNF. Hidalgo-Figueroa *et al.*

(2012) não evidenciaram alteração de GDNF 7, 14 ou 21 dias pós-injeção subcutânea de MPTP em camundongos. Lau *et al.* (2011) não encontraram alteração de GDNF gerada pelo MPTP aos 84 dias pós sua décima administração intraperitoneal. Também, Sun *et al.* (2005) não encontraram diferença no nível de GDNF entre camundongos controles e tratados com 10 doses de MPTP intraperitoneal analisados 60 dias após a décima administração. Contudo, Hirata e Kiushi (2007) encontraram diminuição expressiva de RET - e não de GFR $\alpha$ 1 ou do próprio GDNF - no estriado no dia seguinte a quarta administração subcutânea de MPTP. Em cultura de neurônios mesencefálicos, o tratamento com GDNF não evitou a lesão por MPTP (Hou *et al.*, 1996). Esta contradição entre os achados e a literatura pode resultar da forma sistêmica de administração de MPTP utilizada em contraponto à administração local, período de administração de MPTP nos ditos modelos crônicos, bem como ao prolongado tempo entre a administração da droga e análise de seus efeitos.

Sobre a relação MPTP e BDNF, nosso estudo demonstrou que o MPTP eleva os níveis de BDNF em estriado e não em mesencéfalo ventral aos 4 dias pós sua administração. Lau *et al.* (2011) não observaram aumento de BDNF em estriado e mesencéfalo ventral em resposta ao MPTP. Outro achado do presente estudo que pode relacionar o aumento do nível estriatal de BDNF à infusão do MPTP é que os animais submetidos à infusão da droga apresentaram decréscimo do fator neurotrófico dos 4 aos 42 dias, fato não observado nos animais salina.

Os animais exercitados infundidos com MPTP apresentaram resultados semelhantes aos sedentários com relação aos fatores neurotróficos estudados.

Os resultados deste trabalho que mostraram elevação estriatal do nível de BDNF e decréscimo do nível de GDNF em resposta ao MPTP, dados semelhantes não foram encontrados na literatura. Isto pode sugerir que a via de administração da droga pode influenciar diretamente sua farmacocinética e dinâmica.

Além disso, vem sendo discutida a interação BDNF e GDNF. Já foi evidenciado a co-localização de expressão (Sum *et al.*, 2001) e de receptores (Feng *et al.*, 1999), indicando que ambos os fatores podem atuar no mesmo neurônio dopaminérgico. Sun *et al.* (2005) observaram expressão de BDNF, e não de GDNF, 4 dias após a lesão com 6-OHDA; ao passo que 7 meses pós-lesão o GDNF, e não o BDNF,

estava mais fortemente correlacionado com células tirosina hidroxilase positivas. Esta sugestão de ação coordenada temporalmente entre BDNF e GDNF já foi vista na indução de fatores de transcrição relacionados ao desenvolvimento embrionário de neurônios dopaminérgico mesodiencefálicos (Peng *et al.*, 2011) e expressão de tirosina hidroxilase (Du *et al.*, 1995). Esta relação é reforçada pelas diferentes dinâmicas de ativação de MAPK, sendo que BDNF, pelo seu receptor Trk-B, ativa MAPK de forma rápida e sustentada, enquanto GDNF, pelo seu receptor RET, ativa exclusivamente MAPK de forma lenta e transiente (Feng *et al.* 1999). Por compartilharem as mesmas vias de sinalização intracelular (MAPK e PI3K), Stahl *et al.* (2011) sugeriram que ambos os fatores neurotróficos competem pela mesma via ativada por Trk-B ou RET, mas por BDNF apresentar uma dinâmica de ativação mais rápida, ele utilizaria inicialmente as moléculas intracelulares da via postergando a ação de GDNF. Assim, BDNF estaria mais relacionado à proteção e sobrevivência de neurônios dopaminérgicos em resposta à lesão aguda, enquanto GDNF estaria mais relacionado à plasticidade e arborização dendrítica destes mesmos neurônios, proporcionando a recuperação da lesão.

## **5.6 Influência da infusão de MPTP sobre os níveis de citocinas**

O MPTP no mesencéfalo ventral diminuiu os níveis de TNF- $\alpha$  nos animais sedentários aos 4 e 42 dias. Não houve diferença dos níveis de IL-1 $\beta$  entre os grupos em qualquer dos períodos experimentais. IL-6 não se altera em qualquer período avaliado. Nos animais exercitados infundidos com MPTP apresentaram níveis menores de IL-1 $\beta$  em estriado e mesencéfalo ventral aos 42 dias, e não houve alteração dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6. Sobre IL-10 temos que o MPTP decresce os níveis estriatais desta interleucina em ambos os grupos que receberam a droga aos 4 e aos 42 dias.

No modelo de infusão intranasal de MPTP já foi visto decréscimo da expressão de tirosina hidroxilase no estriado 7 dias pós-infusão, decréscimo do nível estriatal de dopamina 14 dias pós-infusão (Prediger *et al.*, 2006) e morte neuronal a partir de 21 dias (Prediger *et al.*, 2010 e 2006). Por outro lado, a metabolização do MPTP faz com que seus efeitos diminuam com o tempo, e em modelos de administração sistêmica de já foi evidenciado recuperação dos sinais motores e cognitivos

(Mounayar *et al.*, 2007; Lau *et al.*, 1990), ainda não vistos no modelo de infusão intranasal.

## 5.7 Conclusões e perspectivas futuras

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que o treinamento aeróbico em esteira inclinada à 5° por 30 dias, diariamente durante 30 minutos com período de aquecimento e desaquecimento melhorou a aptidão física pelo aumento de velocidade desenvolvida e distância percorrida, aumentou a curiosidade exploratória evidenciada pelo aumento do número de quadrantes cruzados, tempo ativo, velocidade média, número e tempo de *rearing*, aumento dos níveis de BDNF em mesencéfalo ventral, diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 em estriado, possível modulação de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 em estriado.

Já a lesão induzida por MPTP gera morte neuronal dopaminérgica e alterações estruturais como condensação de cromatina, alteração da superfície celular e nuclear, vacuolização e edema de mitocôndria, desfragmentação de retículo endoplasmático e complexo de Golgi, e aumento do número de ribossomos livres. Também altera astrócitos evidenciado pelo recrutamento de filamentos possivelmente intermediários característicos de astrogliose. Além disso, diminui os níveis de GDNF e IL-10, eleva e mantém elevados os níveis de BDNF em estriado, diminui os níveis de TNF- $\alpha$  em mesencéfalo ventral e IL-1 $\beta$  em estriado. Em campo aberto, diminui a curiosidade exploratória a partir de 21 dias pós-infusão da droga pela diminuição do número de quadrantes cruzados, velocidade máxima alcançada, tempo ativo, número e tempo de *rearing*, número de *groomings*, aumento do tempo de *freezing* e latência para realização do primeiro grooming.

Os animais submetidos ao treinamento aeróbico prévio à infusão de MPTP não apresentaram déficit locomotor avaliado em teste de campo aberto, mas sim um aumento de curiosidade exploratória 31 dias pós infusão. A interação MPTP e treinamento aeróbico não impede a queda dos níveis GDNF em estriado, diminui os níveis de IL-10 em estriado e IL-1 $\beta$  em estriado e mesencéfalo ventral.

Sendo assim, concluímos que o treinamento aeróbico prévio à indução de parkinsonismo atenua alterações comportamentais, não influencia os níveis de fatores neurotróficos e modula os níveis de citocinas no sistema nigroestriatal de ratos frente à infusão intranasal de MPTP. Também que este modelo de infusão intranasal de MPTP é reprodutível e válido por mimetizar as alterações histopatológicas e comportamentais comumente observadas em modelos experimentais de parkinsonismo. Além de se apresentar como uma alternativa ao estudo da doença de Parkinson por utilizar uma via de administração pertinente, não-invasiva e relacionada ao desenvolvimento dessa doença e também permitir o acompanhamento de sua evolução, aproximando-se, portanto, das condições reais dos indivíduos parkinsonianos.

Esses resultados evocam a necessidade de avaliar e quantificar as alterações ultraestruturais em diferentes momentos acompanhando a cinética de acometimento celular em mesencéfalo ventral e estriado. Torna-se importante analisar os níveis de citocinas e de fatores neurotróficos em outras datas, entre 4 e 42 dias, para acompanhar a cinética de resposta ao MPTP e ao descondicionamento físico, assim como avaliar os níveis séricos em outras regiões cerebrais de citocinas. Como perspectivas futuras, ressalta-se, também a comparação de protocolos de treinamento de curta duração com crônicos, e avaliar os efeitos do *imprinting genômico* e da senescência em animais de diferentes idades.

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abbott, R. D., Ross, G. W., White, L. R., Sanderson, W. T., Burchfiel, C. M., Kashon, M., Sharp, D. S., et al. (2003). Environmental, life-style, and physical precursors of clinical Parkinson's disease: recent findings from the Honolulu-Asia Aging Study. *Journal of neurology*, 250 Suppl , III30–9.
- ACSM, Diretrizes da ACSM para os testes de esforço e sua prescrição. 6ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2003.
- Adkin, A. L., Frank, J. S., & Jog, M. S. (2003). Fear of falling and postural control in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 18(5), 496–502.
- Agarwal, D., Dange, R., Vila, J., Otamendi, A., & Francis, J. (2012). Detraining Differentially Preserved Beneficial Effects of Exercise on Hypertension: Effects on Blood Pressure, Cardiac Function, Brain Inflammatory Cytokines. *PloS one*, 7(12), e52569.
- Agarwal, D., Welsch, M. A., Keller, J. N., & Francis, J. (2011). Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro-and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR. *basic research in cardiology*, 106(6), 1069–1085.
- Aguiar, A. S., Araújo, A. L., Da-Cunha, T. R., Speck, A. E., Ignácio, Z. M., De-Mello, N., & Prediger, R. D. S. (2009). Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. *Brain research bulletin*, 79(6), 452–7.
- Aguiar, A. S., Tuon, T., Pinho, C. a, Silva, L. a, Andreazza, A. C., Kapczinski, F., Quevedo, J., et al. (2007). Mitochondrial IV complex and brain neurotrophic derived factor responses of mice brain cortex after downhill training. *Neuroscience letters*, 426(3), 171–4.
- Ahmad, S. O., Park, J.-H., Stenho-Bittel, L., & Lau, Y.-S. (2009). Effects of endurance exercise on ventral tegmental area neurons in the chronic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and probenecid-treated mice. *Neuroscience letters*, 450(2), 102–5.
- Airaksinen, M. S., & Saarma, M. (2002). The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(5), 383–94.
- Airaksinen, M., Titievsky, A., & Saarma, M. (1999). GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Molecular and cellular Neuroscience*, 325(13), 313–325.

- Al-Jarrah, M, Pothakos, K., Novikova, L., Smirnova, I. V, Kurz, M. J., Stehno-Bittel, L., & Lau, Y.-S. (2007). Endurance exercise promotes cardiorespiratory rehabilitation without neurorestoration in the chronic mouse model of parkinsonism with severe neurodegeneration. *Neuroscience*, 149(1), 28–37.
- Al-Jarrah, Muhammed, Jamous, M., Al Zailaey, K., & Bweir, S. O. (2010). Endurance exercise training promotes angiogenesis in the brain of chronic/progressive mouse model of Parkinson's Disease. *NeuroRehabilitation*, 26(4), 369–73.
- Aloyz R., Causing C., Gloster A., S. Banji, E. Chang, J. Fawcett, G. Kuchel, F. Miller, Synaptic innervation density is regulated by neuron- derived BDNF, *Neuron* 18 (1997) 257–267.
- Anandhan, a, Janakiraman, U., & Manivasagam, T. (2012). Theaflavin ameliorates behavioral deficits, biochemical indices and monoamine transporters expression against subacute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 218, 257–67.
- Anrather, J., Racchumi, G., & Iadecola, C. (2006). NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *The Journal of biological chemistry*, 281(9), 5657–67.
- Armstrong, R., & Taylor, C. (1993). Glycogen loss in rat muscles during locomotion on different inclines. *Journal of experimental biology*, 144, 135–144.
- Baloh, R. H., Tansey, M. G., Johnson, E. M., & Milbrandt, J. (2000). Functional mapping of receptor specificity domains of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands and production of GFRalpha1 RET-specific agonists. *The Journal of biological chemistry*, 275(5), 3412–20.
- Balthazar, C. H., Leite, L. H. R., Ribeiro, R. M. M., Soares, D. D., & Coimbra, C. C. (2010). Effects of blockade of central dopamine D1 and D2 receptors on thermoregulation, metabolic rate and running performance. *Pharmacological reports* : 62(1), 54–61.
- Balthazar, C. H., Leite, L. H. R., Rodrigues, A. G., & Coimbra, C. C. (2009). Performance-enhancing and thermoregulatory effects of intracerebroventricular dopamine in running rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 93(4), 465–9.
- Bando, Y., Katayama, T., Taniguchi, M., Ishibashi, T., Matsuo, N., Ogawa, S., & Tohyama, M. (2005). RA410 / Sly1 suppresses MPP + and 6-

hydroxydopamine-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Neurobiology of disease*, 18, 143–151

- Baquet, Z. C., Bickford, P. C., & Jones, K. R. (2005). Brain-derived neurotrophic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(26), 6251–9.
- Barbiero, J. K., Santiago, R. M., Lima, M. M. S., Ariza, D., Morais, L. H., Andreatini, R., & Vital, M. a B. F. (2011). Acute but not chronic administration of pioglitazone promoted behavioral and neurochemical protective effects in the MPTP model of Parkinson's disease. *Behavioural brain research*, 216(1), 186–92.
- Barbosa, M. T., Caramelli, P., Maia, D. P., Cunningham, M. C. Q., Guerra, H. L., Lima-Costa, M. F., & Cardoso, F. (2006). Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambuí study). *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 21(6), 800–8.
- Barcia, C., Ros, C. M., Annese, V., Gómez, A., Ros-Bernal, F., Aguado-Yera, D., Martínez-Pagán, M. E., et al. (2011). IFN- $\gamma$  signaling, with the synergistic contribution of TNF- $\alpha$ , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell death & disease*, 2 (4), e142.
- Barde, Y., Edgar, D., & Thoenen, H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal*, 1(5), 549–553.
- Barroso-Chinea, P., Cruz-Muros, I., Aymerich, M. S., Rodríguez-Díaz, M., Afonso-Oramas, D., Lanciego, J. L., & González-Hernández, T. (2005). Striatal expression of GDNF and differential vulnerability of midbrain dopaminergic cells. *The European journal of neuroscience*, 21(7), 1815–27.
- Bartolic, A., Pirtošek, Z., Rozmanc, J., & Ribaric, S. (2005). Postural stability of Parkinson's disease patients is improved by decreasing rigidity. *European journal of Neurology*, (12), 156–159.
- Baumann, C. R. (2012). Epidemiology, diagnosis and differential diagnosis in Parkinson's disease tremor. *Parkinsonism & related disorders*, 18 Suppl 1, S90–2.
- Beaulieu, J., & Gainetdinov, R. (2011). The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological reviews*, 63(1), 182–217.

- Benninger, D. H., Thees, S., Kollias, S. S., Bassetti, C. L., & Waldvogel, D. (2009). Morphological differences in Parkinson's disease with and without rest tremor. *Journal of neurology*, 256(2), 256–63.
- Bergen, J., Toole, T., & Iii, R. E. (2002). Aerobic exercise intervention improves aerobic capacity and movement initiation in Parkinson's disease patients. *NeuroRehabilitation*, 17, 161–168.
- Bezard, E., Gross, C. E., Fournier, M. C., Dovero, S., Bloch, B., & Jaber, M. (1999). Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Experimental neurology*, 155(2), 268–73.
- Bjerken, S.A., Boger, H.A., Nelson, M., Hoffer, B.J., Granholm, A.C., Stromberg, I., 2007. Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor deletion on ventral mesen- cephalic organotypic tissue cultures. *Brain Res.* 1133, 10–19
- Blair, S. N., Kohl, H. W., Paffenbarger, R. S., Clark, D. G., Cooper, K. H., & Larry W. Gibbons. (1989). Fitness and Physical II-Cause Mortality A Prospective Study of Healthy Men and Women. *JAMA*, 262(17), 2395–2401.
- Boulet, S., & Mounayar, S. (2008). Behavioral recovery in MPTP-treated monkeys: neurochemical mechanisms studied by intrastriatal microdialysis. *Neurobiology of Disease*, 28(38), 9575–9584.
- Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211, 51–76.
- Boveris, A., & Navarro, A. (2008). Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free radical biology & medicine*, 44(2), 224–9.
- Bozzi, Y., & Borrelli, E. (1999). Absence of the dopamine D2 receptor leads to a decreased expression of GDNF and NT-4 mRNAs in restricted brain areas. *The European journal of neuroscience*, 11(4), 1275–84.
- Braak, H., & Braak, E. (2000). Pathoanatomy of Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 247(S2), II3–II10.
- Braak, Heiko, Tredici, K. Del, Rüb, U., De Vos, R. a. ., Jansen Steur, E. N. ., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), 197–211.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. (1976). *Anal Biochem.* 72:248-54.

- Brodacki, B., Staszewski, J., Toczyłowska, B., Kozłowska, E., Drela, N., Chalimoniuk, M., & Stepien, A. (2008). Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neuroscience letters*, 441(2), 158–62.
- Brooks, S. P., & Dunnett, S. B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(7), 519–29.
- Burghardt, P. R., Fulk, L. J., Hand, G. a, & Wilson, M. a. (2004). The effects of chronic treadmill and wheel running on behavior in rats. *Brain research*, 1019(1-2), 84–96.
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2003). Hormesis at the national toxicology program (NTP): evidence of hormetic dose responses in NTP dose-range studies. *Nonlinearity in biology, toxicology, and medicine*, 1, 455–467.
- Calne, D. (2005). A definition of Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 11 Suppl 1, S39–40.
- Canning, C. G., Allen, N. E., Dean, C. M., Goh, L., & Fung, V. S. C. (2012). Home-based treadmill training for individuals with Parkinson's disease: a randomized controlled pilot trial. *Clinical rehabilitation*, 26(9), 817–26.
- Cardoso, F., Camargos, S. T., & Silva Júnior, G. a. (1998). Etiology of parkinsonism in a Brazilian movement disorders clinic. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 56(2), 171–5.
- Carvey, P M, Zhao, C. H., Hendey, B., Lum, H., Trachtenberg, J., Desai, B. S., Snyder, J., et al. (2005). 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood-brain barrier permeability. *The European journal of neuroscience*, 22(5), 1158–68.
- Carvey, Paul M, Hendey, B., & Monahan, A. J. (2009). The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *Journal of neurochemistry*, 111(2), 291–314.
- Chan, C. S., Gertler, T. S., & Surmeier, D. J. (2010). A molecular basis for the increased vulnerability of substantia nigra dopamine neurons in aging and Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 25 Suppl 1, S63–70.
- Chao, O. Y., Mattern, C., Silva, A. M. D. S., Wessler, J., Ruocco, L. a, Nikolaus, S., Huston, J. P., et al. (2012). Intranasally applied L-DOPA alleviates

- parkinsonian symptoms in rats with unilateral nigro-striatal 6-OHDA lesions. *Brain research bulletin*, 87(2-3), 340–5.
- Chen, H., Zhang, S. M., Schwarzschild, M. a, Hernán, M. a, & Ascherio, A. (2005). Physical activity and the risk of Parkinson disease. *Neurology*, 64(4), 664–9.
- Chen, X, Li, Y., Kline, a E., Dixon, C. E., Zafonte, R. D., & Wagner, a K. (2005). Gender and environmental effects on regional brain-derived neurotrophic factor expression after experimental traumatic brain injury. *Neuroscience*, 135(1), 11–7.
- Chen, Xuesong, Lan, X., Roche, I., Liu, R., & Geiger, J. D. (2008). Caffeine protects against MPTP-induced blood-brain barrier dysfunction in mouse striatum. *Journal of neurochemistry*, 107(4), 1147–57.
- Chennaoui, M., Drogou, C., & Gomez-Merino, D. (2008). Effects of physical training on IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-1ra concentrations in various brain areas of the rat John Libbey Eurotext Animals. *European Cytokine Network*, 19(1), 8–14.
- Chun, H. S., Gibson, G. E., DeGiorgio, L. a, Zhang, H., Kidd, V. J., & Son, J. H. (2001). Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism. *Journal of neurochemistry*, 76(4), 1010–21.
- Coffey, V., & Hawley, J. (2007). The molecular bases of training adaptation. *Sports medicine*, 37(9), 737–763.
- Cohen, A. D., Tillerson, J. L., Smith, A. D., Schallert, T., & Zigmond, M. J. (2003). Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *Journal of Neurochemistry*, 85(2), 299–305.
- Colbert, L., & Davis, J. (2001). Tissue expression and plasma concentrations of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 following treadmill exercise in mice. *Int J Sports Med*, 22(4), 261–267.
- Colcombe, S. (2006). Aerobic exercise training increases brain volume in aging humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 61(11), 1166–70.
- Colcombe, S. J. (2003). Aerobic fitness reduces brain tissue loss in aging humans. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.*, 58(2), 176–80.
- Cook, R., Lu, L., Gu, J., Williams, R. W., & Smeyne, R. J. (2003). Identification of a single QTL, *Mptp1*, for susceptibility to MPTP-induced substantia nigra pars

compacta neuron loss in mice. *Brain research. Molecular brain research*, 110(2), 279–88.

- Córdova, S. D., Loss, C. M., & De Oliveira, D. L. (2013). Low-intensity physical training recovers object recognition memory impairment in rats after early-life induced Status epilepticus. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 1–6.
- Cotman, C. W., & Berchtold, N. C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in neurosciences*, 25(6), 295–301.
- Couto, P. a, Filipe, V. M., Magalhães, L. G., Pereira, J. E., Costa, L. M., Melo-Pinto, P., Bulas-Cruz, J., et al. (2008). A comparison of two-dimensional and three-dimensional techniques for the determination of hindlimb kinematics during treadmill locomotion in rats following spinal cord injury. *Journal of neuroscience methods*, 173(2), 193–200.
- Cruise, K. E., Bucks, R. S., Loftus, a M., Newton, R. U., Pegoraro, R., & Thomas, M. G. (2011). Exercise and Parkinson's: benefits for cognition and quality of life. *Acta neurologica Scandinavica*, 123(1), 13–9.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., & Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91(2), 231–41.
- Dauer, W., & Ho, C. C.-Y. (2010). The biology and pathology of the familial Parkinson's disease protein LRRK2. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 25 Suppl 1(July 2008), S40–3.
- DeLong, MR (2000) The Basal Ganglia in *Principles of neuroscience*, Eric R. Kandel, ER; Schwartz, JH; Jessell; TM (2000), 4<sup>a</sup> edição, p: 854-872, McGraw-Hill Professional editors.
- Del Zompo, M., Piccardi, M. P., Ruiu, S., Quartu, M., Gessa, G. L., & Vaccari, A. (1993). Selective MPP<sup>+</sup> uptake into synaptic dopamine vesicles: possible involvement in MPTP neurotoxicity. *British journal of pharmacology*, 109(2), 411–4.
- Deschenes, M., Roby, M., & Glass, E. (2011). Aging influences adaptations of the neuromuscular junction to endurance training. *Neuroscience*, 190, 56–66.
- Dick, F. D., De Palma, G., Ahmadi, A., Scott, N. W., Prescott, G. J., Bennett, J., Semple, S., et al. (2007). Environmental risk factors for Parkinson's disease

and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occupational and environmental medicine*, 64(10), 666–72. doi:10.1136/oem.2006.027003

- Dishman, R K, Armstrong, R. B., Delp, M. D., Graham, R. E., & Dunn, a L. (1988). Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. *Physiology & behavior*, 43(5), 541–6.
- Dishman, R. (1997). Brain monoamines, exercise, and behavioral stress: animal models. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 29(1), 63–74.
- Dishman, Rod K, Berthoud, H.-R., Booth, F. W., Cotman, C. W., Edgerton, V. R., Fleshner, M. R., Gandevia, S. C., et al. (2006). *Neurobiology of exercise. Obesity* (Silver Spring, Md.), 14(3), 345–56.
- Dluzen, D., & Kefalas, G. (1996). effects of intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) upon catecholamine concentrations within olfactory bulbs and corpus striatum. *Brain research*, 741(1-2), 215–219.
- Dornbos, D. 3rd, & Ding, Y. (2012). Mechanisms of neuronal damage and neuroprotection underlying ischemia/reperfusion injury after physical exercise. *Curr Drug Targets.*, 13(2), 247–262.
- Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., Marshall, F. J., et al. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68(5), 384–6.
- Dowding, C. H., Shenton, C. L., & Salek, S. S. (2006). A Review of the Health-Related Quality of Life and Economic Impact of Parkinson's Disease. *Drugs & Aging*, 23(9), 693–721.
- Du, X., Stull, N. D., & Iacovitti, L. (1995). Brain-derived neurotrophic factor works coordinately with partner molecules to initiate tyrosine hydroxylase expression in striatal neurons. *Brain research*, 680, 229–233.
- Dutra, M. F., Jaeger, M., Ilha, J., Kalil-Gaspar, P. I., Marcuzzo, S., & Achaval, M. (2012). Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 33(5), 1137–44.
- Duty, S., & Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1357–91.

- Eriksen, J. L., Wszolek, Z., & Petrucelli, L. (2005). Molecular pathogenesis of Parkinson disease. *Archives of neurology*, 62(3), 353–7.
- Faherty, C. J., Raviie Shepherd, K., Herasimtschuk, A., & Smeyne, R. J. (2005). Environmental enrichment in adulthood eliminates neuronal death in experimental Parkinsonism. *Brain research. Molecular brain research*, 134(1), 170–9.
- Feng, L., Wang, C., & Jiang, H. (1999). Differential signaling of glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor in cultured ventral mesencephalic neurons. *Neuroscience*, 93(1), 265–273.
- Fischer, M. S., Schilling, N., Schmidt, M., Haarhaus, D., & Witte, H. (2002). Basic limb kinematics of small therian mammals. *The Journal of experimental biology*, 205(Pt 9), 1315–38.
- Fisher, B. E., Petzinger, G. M., Nixon, K., Hogg, E., Bremmer, S., Meshul, C. K., & Jakowec, M. W. (2004). Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse basal ganglia. *Journal of neuroscience research*, 77(3), 378–90.
- Fisher, B., Wu, A., & Salem, G. (2008). The Effect of Exercise Training in Improving Motor Performance and Corticomotor Excitability in Persons With Early Parkinson's Disease. *Arch Phys Med Rehabil.*, 89(7), 1221–1229.
- Fonck, C., & Baudry, M. (2003). Rapid reduction of ATP synthesis and lack of free radical formation by MPP<sup>+</sup> in rat brain synaptosomes and mitochondria. *Brain research*, 975, 214–221.
- Frasier, C. R., Moore, R. L., & Brown, D. a. (2011). Exercise-induced cardiac preconditioning: how exercise protects your achy-breaky heart. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 111(3), 905–15.
- Frim, D. M., Uhler, T. a, Galpern, W. R., Beal, M. F., Breakefield, X. O., & Isacson, O. (1994). Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 5104–8.
- Fulk, L., Stock, H., & Lynn, A. (2004). Chronic physical exercise reduces anxiety-like behavior in rats. *Int J Sports Med*, 25(1), 78–82.

- Fusari, A., & Molina, J. (2009a). Olfato, envejecimiento fisiológico y enfermedades neurodegenerativas: I. Anatomía y exploración clínica. *Revista de neurología*, 49(6), 321–326.
- Fusari, A., & Molina, J. (2009b). Olfato, envejecimiento fisiológico y enfermedades neurodegenerativas: II. Envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas. *Revista de neurología*, 49(7), 363–369.
- Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Jones, S. R., & Caron, M. G. (1997). Dopamine transporter is required for in vivo MPTP neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *Journal of neurochemistry*, 69(3), 1322–5.
- Gao, H.-M., & Hong, J.-S. (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends in immunology*, 29(8), 357–65.
- Gao, H.-M., Kotzbauer, P. T., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2008). Neuroinflammation and oxidation/nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(30), 7687–98.
- Gao, H.-M., Liu, B., Zhang, W., & Hong, J.-S. (2003). Critical role of microglial NADPH oxidase-derived free radicals in the in vitro MPTP model of Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(13), 1954–6.
- Gao, X, Cassidy, A., Schwarzschild, M. a, Rimm, E. B., & Ascherio, A. (2012). Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 78(15), 1138–45.
- Gao, Xiang, Chen, H., Schwarzschild, M. a, & Ascherio, A. (2011). A prospective study of bowel movement frequency and risk of Parkinson's disease. *American journal of epidemiology*, 174(5), 546–51.
- Gee, J. R., & Keller, J. N. (2005). Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(6), 1145–50.
- Gerecke, K. M., Jiao, Y., Pagala, V., & Smeyne, R. J. (2012). Exercise does not protect against MPTP-induced neurotoxicity in BDNF haploinsufficient mice. *PloS one*, 7(8), e43250.

- Giasson, B. I. (2000). Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective alpha -Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions. *Science*, 290(5493), 985–989.
- Giladi, N. (2009). Mobility and exercise in movement disorders. *Parkinsonism & related disorders*, 15 Suppl 3, S46–8.
- Goetz, C. G. (2011). The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a008862.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E., & Viña, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free radical biology & medicine*, 44(2), 126–31.
- Gomez-Pinilla, F., Ying, Z., Roy, R. R., Molteni, R., & Edgerton, V. R. (2002). Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. *Journal of neurophysiology*, 88(5), 2187–95.
- Goodwin, V. a, Richards, S. H., Taylor, R. S., Taylor, A. H., & Campbell, J. L. (2008). The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 23(5), 631–40.
- Gorton, L. M., Vuckovic, M. G., Vertelkina, N., Petzinger, G. M., Jakowec, M. W., & Wood, R. I. (2010). Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse. *Behavioural brain research*, 213(2), 253–62.
- Gould, T. D. (2009). Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice Characterization Using Behavioral Tests (pp. 1–20).
- Grammas, P., Martinez, J., & Miller, B. (2011). Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert reviews in molecular medicine*, 13(June), e19.
- Guo, H., Tang, Z., Yu, Y., Xu, L., Jin, G., & Zhou, J. (2002). Apomorphine induces trophic factors that support fetal rat mesencephalic dopaminergic neurons in cultures. *European Journal of Neuroscience*, 16(10), 1861–1870
- Guttman, M., Slaughter, P. M., Theriault, M.-E., DeBoer, D. P., & Naylor, C. D. (2004). Parkinsonism in Ontario: comorbidity associated with hospitalization in a large cohort. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 19(1), 49–53.

- Hardy, J. (2010). Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron*, 68(2), 201–6.
- Haskell, W. L., Lee, I.-M., Pate, R. R., Powell, K. E., Blair, S. N., Franklin, B. a, Macera, C. a, et al. (2007). Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(8), 1423–34.
- Hazell, a S., & Norenberg, M. D. (1997). Manganese decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *Neurochemical research*, 22(12), 1443–7.
- Hebert, M. a, Van Horne, C. G., Hoffer, B. J., & Gerhardt, G. a. (1996). Functional effects of GDNF in normal rat striatum: presynaptic studies using in vivo electrochemistry and microdialysis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 279(3), 1181–90.
- Henderson, K. K., Wagner, H., Favret, F., Britton, S. L., Lauren, G., Wagner, P. D., Gonzalez, N. C., et al. (2002). Determinants of maximal O<sub>2</sub> uptake in rats selectively bred for endurance running capacity. *Journal of applied physiology*, 93, 1265–1274.
- Hidalgo-figueroa, M., Bonilla, S., Gutie, F., & Pascual, A. (2012). Neurobiology of Disease GDNF Is Predominantly Expressed in the PV2 Neostriatal Interneuronal Ensemble in Normal Mouse and after Injury of the Nigrostriatal Pathway. *Neurobiology of disease*, 32(3), 864–872.
- Hinkerohe, D., Smikalla, D., Haghikia, A., Heupel, K., Haase, C. G., Dermietzel, R., & Faustmann, P. M. (2005). Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia*, 52(2), 85–97.
- Hirata, Y., & Kiuchi, K. (2007). Rapid down regulation of Ret following exposure of dopaminergic neurons to neurotoxins. *Journal of neurochemistry*, 102, 1606–1613.
- Hirsch, E. C., Hunot, S., & Hartmann, A. (2005). Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 11 Suppl 1, S9–S15.
- Hodson-Tole, E. F., & Wakeling, J. M. (2010). The influence of strain and activation on the locomotor function of rat ankle extensor muscles. *The Journal of experimental biology*, 213(2), 318–30. doi:10.1242/jeb.031872

- Hoomissen, J. Van, & Chambliss, H. (2003). Effects of chronic exercise and imipramine on mRNA for BDNF after olfactory bulbectomy in rat. *Brain research*, 974, 228–235.
- Hornykiewicz, O. (2001). Chemical neuroanatomy of the basal ganglia — normal and in Parkinson's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 22, 3–12.
- Hou, J., Lin, L., & Mytilineou, C. (1996). Glial cell line-derived neurotrophic factor exerts neurotrophic effects on dopaminergic neurons in vitro and promotes their survival and regrowth after damage by 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Journal of neurochemistry*, 66(1), 74–82.
- Howells, D. W., Porritt, M. J., Wong, J. Y., Batchelor, P. E., Kalnins, R., Hughes, a J., & Donnan, G. a. (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Experimental neurology*, 166(1), 127–35.
- Hudson, J., Granholm, a C., Gerhardt, G. a, Henry, M. a, Hoffman, A., Biddle, P., Leela, N. S., et al. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor augments midbrain dopaminergic circuits in vivo. *Brain research bulletin*, 36(5), 425–32.
- Hung, C.-H. (2008). Exercise pretraining attenuates endotoxin-induced hemodynamic alteration in type I diabetic rats. *Applied Physiology Nutr. Metabolism.*, 33, 976–938.
- Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debre, P., Agid, Y., et al. (1999). Fc e RII / CD23 Is Expressed in Parkinson's Disease and Induces , In Vitro , Production of Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  in Glial Cells. *The Journal of neuroscience*, 19(9), 3440–3447.
- IDB, 2009. Disponível em <http://www.datasus.gov.br/idb>
- IBGE. (2000). Idosos no Brasil. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/perfilidoso/default.shtm>
- Ischiropoulos, H., & Al-Mehdi, a B. (1995). Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS letters*, 364(3), 279–82.
- Jackson-lewis, V., Jakowec, M., Burke, R. E., & Przedborski, S. (1995). Time Course and Morphology of Dopaminergic Neuronal Death Caused by the Neurotoxin. *neurodegeneration*, 4, 257–269.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 79(4), 368–76.

- Jenner, P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 53(3 suppl), 26–38.
- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(10), 1861–7.
- Kandel, ER (2000) Nerve cells in behavior in *Principles of neuroscience*, Eric R. Kandel, ER; Schwartz, JH; Jessell; TM (2000), 4ª edição, p: 5-18, McGraw-Hill Professional editors.
- Kaya, M. (2003). Coordination of medial gastrocnemius and soleus forces during cat locomotion. *Journal of Experimental Biology*, 206(20), 3645–3655.
- Kemi, O. J., Haram, P. M., Loennechen, J. P., Osnes, J.-B., Skomedal, T., Wisløff, U., & Ellingsen, Ø. (2005). Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovascular research*, 67(1), 161–72.
- Kim, H., Heo, H.-I., Kim, D.-H., Ko, I.-G., Lee, S.-S., Kim, S.-E., Kim, B.-K., et al. (2011). Treadmill exercise and methylphenidate ameliorate symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder through enhancing dopamine synthesis and brain-derived neurotrophic factor expression in spontaneous hypertensive rats. *Neuroscience letters*, 504(1), 35–9.
- King, L. a, & Horak, F. B. (2009). Delaying mobility disability in people with Parkinson disease using a sensorimotor agility exercise program. *Physical therapy*, 89(4), 384–93.
- Klegeris, A., Pelech, S., Giasson, B. I., Maguire, J., Zhang, H., McGeer, E. G., & McGeer, P. L. (2008). Alpha-synuclein activates stress signaling protein kinases in THP-1 cells and microglia. *Neurobiology of aging*, 29(5), 739–52.
- Koch, L. G., Kemi, O. J., Qi, N., Leng, S. X., Bijma, P., Gilligan, L. J., Wilkinson, J. E., et al. (2011). Intrinsic aerobic capacity sets a divide for aging and longevity: Koch & Kemi-Rat models link exercise capacity with mortality. *circulation research*, 109(10), 1162–1172.
- Kortekaas, R., Leenders, K. L., Van Oostrom, J. C. H., Vaalburg, W., Bart, J., Willemsen, A. T. M., & Hendrikse, N. H. (2005). Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Annals of neurology*, 57(2), 176–9.
- Koutsilieris, E., Scheller, C., Grünblatt, E., Nara, K., Li, J., & Riederer, P. (2002). Free radicals in Parkinson's disease. *Journal of neurology*, 249 Suppl, II1–5.

- Kwakkel, G., De Goede, C. J. T., & Van Wegen, E. E. H. (2007). Impact of physical therapy for Parkinson's disease: a critical review of the literature. *Parkinsonism & related disorders*, 13 Suppl 3, S478–87.
- Langston, J. (1985). The case of the tainted heroin. *Science*, 25(1), 34–40.
- Langston, J. W., Forno, L. S., Tetud, J., & Reeves, A. G. (1999). Evidence of Active Nerve Cell Degeneration in the Substantia Nigra of Humans Years. *Annals of neurology*, 46, 598–605.
- Lau, Y.-S., Patki, G., Das-Panja, K., Le, W.-D., & Ahmad, S. O. (2011). Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *The European journal of neuroscience*, 33(7), 1264–74.
- Lau, Y.S., Trobough, K.L., Crampton, J.M., Wilson, J.A., Effects of probenecid on striatal dopamine depletion in acute and long-term 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mice, *Gen. Pharmacol.* 21 (1990) 181–187.
- Laurin, D., Verreault, R., Lindsay, J., MacPherson, K., & Rockwood, K. (2001). Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol.*, 58(3), 498–504.
- Le, W., Rowe, D., Xie, W., & Ortiz, I. (2001). Microglial activation and dopaminergic cell injury: an in vitro model relevant to Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience*, 21(21), 8447–8455.
- Leibson, C. L., Long, K. H., Maraganore, D. M., Bower, J. H., Ransom, J. E., O'Brien, P. C., & Rocca, W. a. (2006). Direct medical costs associated with Parkinson's disease: a population-based study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 21(11), 1864–71.
- Leite, L. H. R., Lacerda, A. C. R., Balthazar, C. H., Marubayashi, U., & Coimbra, C. C. (2009). Central angiotensin AT1 receptors are involved in metabolic adjustments in response to graded exercise in rats. *Peptides*, 30(10), 1931–5.
- Leroy, E., Boyer, R., Auburger, G., & Leube, B. (1998). The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 395, 451–452.
- Levivier, M., & Przedborski, S. (1995). fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience*, 15(12), 7810–7820.

- Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S., & Collins, F. (1993). GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5111), 1130–2.
- Lindgren, P. (2004). Economic evidence in Parkinson's disease: a review. *The European Journal of Health Economics, Suppl(1)*, S63–66.
- Liu, R., Guo, X., Park, Y., Huang, X., Sinha, R., Freedman, N. D., Hollenbeck, A. R., et al. (2012). Caffeine intake, smoking, and risk of Parkinson disease in men and women. *American journal of epidemiology*, 175(11), 1200–7.
- Liu, W., & Zhou, C. (2012). Corticosterone reduces brain mitochondrial function and expression of mitofusin, BDNF in depression-like rodents regardless of exercise preconditioning. *Psychoneuroendocrinology*, 37(7), 1057–70.
- Lovatel, G. A., Elsnerb, V. R., Bertoldib, K., et al. (2013). Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 101 (March), 94–102.
- Lotharius, J., & O'Malley, K. L. (2000). The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *The Journal of biological chemistry*, 275(49), 38581–8.
- Lu, B., Pang, P. T., & Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(8), 603–14.
- Lucchini, R., & Zimmerman, N. (2009). Lifetime cumulative exposure as a threat for neurodegeneration: need for prevention strategies on a global scale. *Neurotoxicology*, 30(6), 1144–8.
- Luchtman, D. W., Shao, D., & Song, C. (2009). Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Physiology & behavior*, 98(1-2), 130–8.
- Macrae, P. G., Spirduso, W. W., Waiters, T. J., Farrar, R. P., & Wilcox, R. E. (1987). Endurance training effects on striatal D2 dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolites in presenescent older rats. *Psychopharmacology*, 23, 7–11.
- Marchese, R., Bove, M., & Abbruzzese, G. (2003). Effect of cognitive and motor tasks on postural stability in Parkinson's disease: a posturographic study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 18(6), 652–8.

- Mark, M. Van Der, Brouwer, M., Kromhout, H., Nijssen, P., Huss, A., & Vermeulen, R. (2012). Review Is Pesticide Use Related to Parkinson Disease? Some Clues to Heterogeneity in Study Results. *Environmental health perspectives*, 340(3), 340–347.
- Marras, C., & Lang, A. (2008). Invited article: changing concepts in Parkinson disease: moving beyond the decade of the brain. *Neurology*, 70(21), 1996–2003.
- Matinolli, M., Korpelainen, J. T., Sotaniemi, K. a, Myllylä, V. V, & Korpelainen, R. (2011). Recurrent falls and mortality in Parkinson's disease: a prospective two-year follow-up study. *Acta neurologica Scandinavica*, 123(3), 193–200.
- McDonald, N. Q., & Chao, M. V. (1995). Structural determinants of neurotrophin action. *The Journal of biological chemistry*, 270(34), 19669–72.
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2004). Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, 10 Suppl 1, S3–7.
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2008). Glial reactions in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 23(4), 474–83.
- Mello, P., & Benetti, F. (2008). Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 80, 301–309.
- Melo, R. M., Martinho, E., & Michelini, L. C. (2003). Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*, 42(4), 851–7.
- Minami, N., Li, Y., Guo, Q., Kawamura, T., Mori, N., Nagasaka, M., Ogawa, M., et al. (2007). Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and exercise training on exercise capacity and skeletal muscle. *Journal of hypertension*, 25(6), 1241–8.
- Miyai, I., Fujimoto, Y., Ueda, Y., Yamamoto, H., Nozaki, S., Saito, T., & Kang, J. (2000). Treadmill training with body weight support: its effect on Parkinson's disease. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 81(7), 849–52.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Mizuno, Y., Narabayashi, H., Riederer, P., & Nagatsu, T. (1996a). Bcl-2 Protein Is Increased in the Brain From Parkinsonian Patients. *Neuroscience letters*, 215(2), 137–9.

- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Mizuno, Y., Narabayashi, H., Riederer, P., & Nagatsu, T. (1996b). The soluble form of Fas molecule is elevated in parkinsonian brain tissues. *Neuroscience letters*, 220(3), 195–8.
- Mogi, M., Harada, M., & Narabayashi, H. (1996). Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- $\beta$  levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's. *Neuroscience letters*, 211, 13–16.
- Mogi, M., Harada, M., Riederer, P., Narabayashi, H., Fujita, K., & Nagatsu, T. (1994). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neuroscience letters*, 165(1-2), 208–10.
- Mogi, M., Togari, A., & Kondo, T. (2000). Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *Journal of neural transmission*, 107, 335–341.
- Moreira, E. L. G., Rial, D., Aguiar, A. S., Figueiredo, C. P., Siqueira, J. M., DalBó, S., Horst, H., et al. (2010). -rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. *Journal of neural transmission*, 117(12), 1337–51.
- Morris, M. E., & Iansek, R. (1997). Gait disorders in Parkinson's disease: a framework for physical therapy practice. *Neurology Report.*, (21), 125–131.
- Mosser, D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), 209–212.
- Mota, B., Leticia, M., Mauren, P., Souza, A., Fernando, L., Silva, A., Roberto, A., et al. (2012). Exercise Pre-conditioning Reduces Brain Inflammation and Protects against Toxicity Induced by Traumatic Brain Injury : Behavioral and Neurochemical Approach, 175–184.
- Mounayar S, Boulet S, Tande´ D, Jan C, Pessiglione M, Hirsch EC, Fe´ger J, Savasta M, Franc\_ois C, Tremblay L (2007) A new model to study compensatory mechanisms in MPTP-treated monkeys exhibiting recovery. *Brain* 130:2898–2914.
- Muangpaisan, W., Mathews, A., Hori, H., & Seidel, D. (2011). A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. *J Med Assoc Thai*, 94(6), 749–755.

- Nagahara, A. H., & Tuszynski, M. H. (2011). Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nature reviews. Drug discovery*, 10(3), 209–19.
- Nagatsu, T. (2002). Parkinson's disease: changes in apoptosis-related factors suggesting possible gene therapy. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 109(5-6), 731–45.
- Nagatsu, T., & Sawada, M. (2005). Inflammatory Process in Parkinson ' s Disease : Role for Cytokines. *Current pharmaceutical design*, 11, 999–1016.
- Nascimento, P. S. Do, Lovatel, G. a, Barbosa, S., Ilha, J., Centenaro, L. a, Malysz, T., Xavier, L. L., et al. (2011). Treadmill training improves motor skills and increases tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta in diabetic rats. *Brain research*, 1382, 173–80.
- Nichol, K., & Poon, W. (2008). Exercise alters the immune profile in Tg2576 Alzheimer mice toward a response coincident with improved cognitive performance and decreased amyloid. *Journal of neuroinflammation*, 5(13), 1-15.
- Nitsch, R., Pohl, E. E., Smorodchenko, A., Infante-Duarte, C., Aktas, O., & Zipp, F. (2004). Direct impact of T cells on neurons revealed by two-photon microscopy in living brain tissue. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(10), 2458–64.
- Obeso, J.A. et al. (2010) Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat. Med.* 16, 653–661
- Okubo, H., Miyake, Y., Sasaki, S., Murakami, K., Tanaka, K., Fukushima, W., Kiyohara, C., et al. (2012). Dietary patterns and risk of Parkinson's disease: a case-control study in Japan. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, 19(5), 681–8.
- OMS. (2004a). Global death daly country estimates 2004. Retrieved from <http://www.who.int/research/en/>
- OMS. (2004b). Prevalence for selected causes, in WHO Regions (a), estimates for 2004. Retrieved from <http://www.who.int/research/en/>
- OMS. (2008). Global burden disease 2008. Retrieved from <http://www.who.int/research/en/>

- Oo, T., Marchionini, D., & Yarygina, O. (2009). Brain-derived neurotrophic factor regulates early postnatal developmental cell death of dopamine neurons of the substantia nigra in vivo. *Mol Cell Neurosci.*, 41(4), 440–447.
- Paratcha, G., Ledda, F., Baars, L., Culpier, M., Besset, V., Anders, J., Scott, R., et al. (2001). Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron*, 29(1), 171–84.
- Parkash, V., & Goldman, A. (2009). Comparison of GFL-GFRalpha complexes: further evidence relating GFL bend angle to RET signalling. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 65(Pt 6), 551–8.
- Parkinson, J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 14(2), 223–36.
- Pascual, A., Hidalgo-Figueroa, M., Piruat, J. I., Pintado, C. O., Gómez-Díaz, R., & López-Barneo, J. (2008). Absolute requirement of GDNF for adult catecholaminergic neuron survival. *Nature neuroscience*, 11(7), 755–61.
- Patki, G., Che, Y., & Lau, Y.-S. (2009). Mitochondrial dysfunction in the striatum of aged chronic mouse model of Parkinson's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 1(December), 3.
- Peng, C., Aron, L., Li, M., Wurst, W., Prakash, N., & Le, W. (2011). Pitx3 Is a Critical Mediator of GDNF-Induced BDNF Expression in Nigrostriatal Dopaminergic Neurons. *The Journal of neuroscience*, 31(36), 12802–12815.
- Perez, X., & Parameswaran, N. (2008). Pre-synaptic dopaminergic compensation after moderate nigrostriatal damage in non-human primates. *Journal of Neurochemistry*, 105(5), 1861–1872.
- Perry, V. H., Cunningham, C., & Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nature reviews. Immunology*, 7(2), 161–7.
- Pervaiz, N., & Hoffman-Goetz, L. (2011). Freewheel training alters mouse hippocampal cytokines. *Int J Sports Med*, 32(11), 889–895.
- Peterson, A., & Nutt, J. (2008). Treatment of Parkinson's disease with trophic factors. *Neurotherapeutics*, 5(April), 270–280.

- Petzinger, G. M., Walsh, J. P., Akopian, G., Hogg, E., Abernathy, A., Arevalo, P., Turnquist, P., et al. (2007). Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(20), 5291–300.
- Poteryaev, D., Titievsky, A., Sun, Y. F., Thomas-Crusells, J., Lindahl, M., Billaud, M., Arumäe, U., et al. (1999). GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1. *FEBS letters*, 463(1-2), 63–6.
- Pothakos, K., Kurz, M. J., & Lau, Y.-S. (2009). Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. *BMC neuroscience*, 10, 6.
- Prediger, R., Aguiar, A., Moreira, E., Matheus, F., Castro, A., Walz, R., De Bem, A., et al. (2011). The Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP): A New Rodent Model to Test Palliative and Neuroprotective Agents for Parkinson's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 17(5), 489–507.
- Prediger, R. D. S., Aguiar, A. S., Matheus, F. C., Walz, R., Antoury, L., Raisman-Vozari, R., & Doty, R. L. (2012). Intranasal administration of neurotoxicants in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 21(1), 90–116.
- Prediger, R. D. S., Aguiar, A. S., Rojas-Mayorquin, A. E., Figueiredo, C. P., Matheus, F. C., Ginestet, L., et al. (2010). Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 17(2), 114–29.
- Prediger, R. D. S., Batista, L. C., Medeiros, R., Pandolfo, P., Florio, J. C., & Takahashi, R. N. (2006). The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 202(2), 391–403.
- Prediger, R. D. S., Rial, D., Medeiros, R., Figueiredo, C. P., Doty, R. L., & Takahashi, R. N. (2009). Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 629–36.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Djaldetti, R., Liberatore, G., Vila, M., Vukosavic, S., & Almer, G. (2000). The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restorative neurology and neuroscience*, 16(2), 135–142.

- Przedborski, S., Jackson-lewis, V., Naini, A. B., Petzinger, G., Miller, R., & Akram, M. (2001). The parkinsonian toxin (MPTP): a technical review of its utility and safety. *Journal of neurochemistry*, 76, 1265–1274.
- Przedborski, S., Tieu, K., Perier, C., & Vila, M. (2004a). MPTP as a Mitochondrial Neurotoxic Model of Parkinson ' s Disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(4).
- Przedborski, S., Tieu, K., Perier, C., & Vila, M. (2004b). MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 36(4), 375–9.
- Przedborski, S., & Vila, M. (2003). the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model a tool to explore the pathogenesis of parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, 189–198.
- Purves, D. (2001) Modulation of movement by basal ganglia in *Neuroscience*, 2<sup>a</sup> edição,p: 417-434. Purve, D; Augustine, GJ; Fitzpatrick, D; et al; Sinauer Associates; 2001
- Rachetti, a L. F., Arida, R. M., Patti, C. L., Zanin, K. a, Fernades-Santos, L., Frussa-Filho, R., Da Silva, S. G., et al. (2013). Fish oil supplementation and physical exercise program: distinct effects on different memory tasks. *Behavioural brain research*, 237, 283–9.
- Radak, Z., Taylor, A., Ohno, H., & Goto, S. (2001). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev.*, 7, 90–107.
- Ratel, S., & Gryson, C. (2012). Detraining-induced alterations in metabolic and fitness markers after a multicomponent exercise-training program in older men. *Applied Physiology and nutr. Metab*, 37, 72–79.
- Reichardt, L. F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361(1473), 1545–64.
- Riederer, P., & Wuketich, S. (1976). Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission*, 301(38), 277–301.
- Rodrigues, B., Figueroa, D. M., Mostarda, C. T., Heeren, M. V, Irigoyen, M.-C., & De Angelis, K. (2007). Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular diabetology*, 6, 38.

- Rajo, A. I., Montero, C., Salazar, M., Close, R. M., Fernández-Ruiz, J., Sánchez-González, M. a, De Sagarra, M. R., et al. (2006). Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. *The European journal of neuroscience*, 24(7), 1874–84.
- Ryu, J., Shin, W., Kim, J., Joe, E., & Lee, Y. (2002). Trisialoganglioside GT1b induces in vivo degeneration of nigral dopaminergic neurons: role of microglia. *Glia*, 23(July 2001), 15–23.
- Saavedra, A., Baltazar, G., & Duarte, E. P. (2008). Driving GDNF expression: the green and the red traffic lights. *Progress in neurobiology*, 86(3), 186–215.
- Saper, CB (2000) Brain Stem, Reflexive Behavior, and the Cranial Nerves; in *Principles of neuroscience*, Eric R. Kandel, ER; Schwartz, JH; Jessell; TM (2000), 4<sup>a</sup> edição, p: 874-889, McGraw-Hill Professional editors.
- Savica, R., Rocca, W. a, & Ahlskog, J. E. (2010). When does Parkinson disease start? *Archives of neurology*, 67(7), 798–801.
- Scalzo, P., Kümmer, A., Cardoso, F., & Teixeira, A. L. (2009). Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor-alpha receptor-1 in patients with Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology*, 216(1-2), 122–5.
- Scalzo, P., Kümmer, A., Cardoso, F., & Teixeira, A. L. (2010). Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. *Neuroscience letters*, 468(1), 56–8.
- Schmidt, M. (2008). Forelimb proportions and kinematics: how are small primates different from other small mammals? *The Journal of experimental biology*, 211(Pt 24), 3775–89.
- Senna, P. N., Ilha, J., Baptista, P. P. A., Do Nascimento, P. S., Leite, M. C., Paim, M. F., Gonçalves, C. A., et al. (2011). Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metabolic brain disease*, 26(4), 269–79.
- Shi, M., Huber, B., & Zhang, J. (2010). Biomarkers for cognitive impairment in Parkinson disease. *Brain Pathology*, 20(3), 660–671.
- Shin, E., Garcia, J., Winkler, C., Björklund, A., & Carta, M. (2012). Neurobiology of Disease Serotonergic and dopaminergic mechanisms in graft-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson ' s disease. *Neurobiology of Disease*, 47(3), 393–406.

- Skidmore, F. M. (2008). Pilot safety and feasibility study of treadmill aerobic exercise in Parkinson disease with gait impairment. *The Journal of Rehabilitation Research and Development*, 45(1), 117–124.
- Skidmore, F., & Mackman, C. (2008). Daily ambulatory activity levels in idiopathic Parkinson disease. *The Journal of Rehabilitation Research and Development Rehabil Research & Development*, 45(9), 1–8.
- Smeyne, R. J., & Jackson-Lewis, V. (2005). The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain research. Molecular brain research*, 134(1), 57–66.
- Smith, B. a, Goldberg, N. R. S., & Meshul, C. K. (2011). Effects of treadmill exercise on behavioral recovery and neural changes in the substantia nigra and striatum of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse. *Brain research*, 1386, 70–80.
- Song, D. D., Shults, C. W., Sisk, A., Rockenstein, E., & Masliah, E. (2004). Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human  $\alpha$ -synuclein transgenic mice after treatment with MPTP 1. *Experimental neurology*, 186, 158–172.
- Spires, T. L., & Hannan, A. J. (2005). Nature, nurture and neurology: gene-environment interactions in neurodegenerative disease. FEBS Anniversary Prize Lecture delivered on 27 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw. *The FEBS journal*, 272(10), 2347–61.
- Sriram, K., Benkovic, S., Miller, D., & O'Callaghan, J. (2002). Obesity exacerbates chemically induced neurodegeneration. *Neuroscience*, 115(4), 1335–1346.
- Stahl, K., Mylonakou, M. N., Skare, Ø., Amiry-moghaddam, M., & Torp, R. (2011). Cytoprotective effects of growth factors : BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson ' s disease. *Brain Research*, 1378, 105–118.
- Sun, M., Kong, L., Wang, X., Lu, X., Gao, Q., & Geller, A. I. (2005). Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Brain research*, 1052(2), 119–129.
- Surmeier, D. J., Carrillo-Reid, L., & Bargas, J. (2011). Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience*, 198, 3–18.
- Suzuki, T., Fujita, S., & Narimatsu, S. (1992). Cytochrome P450 isozymes catalyzing 4-hydroxylation of parkinsonism-related compound 1, 2, 3, 4-tetrahydro-isquinoline in rat liver microsomes. *The FASEB journal*, 6, 771–776.

- Tajiri, N., Yasuhara, T., Shingo, T., Kondo, A., Yuan, W., Kadota, T., Wang, F., et al. (2010). Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain research*, 1310, 200–7.
- Tansey, M. G., McCoy, M. K., & Frank-Cannon, T. C. (2007). Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental neurology*, 208(1), 1–25.
- Teismann, P., Tieu, K., Cohen, O., Choi, D.-K., Wu, D. C., Marks, D., Vila, M., et al. (2003). Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 18(2), 121–9.
- Teive, H. a. G. (1998). O papel de Charcot na doença de Parkinson. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 56(1), 141–145.
- Tillerson, J. L., Cohen, A. D., Caudle, W. M., Zigmond, M. J., Schallert, T., & Miller, G. W. (2002). Forced nonuse in unilateral parkinsonian rats exacerbates injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), 6790–9.
- Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L., & Ögren, S. (1995). Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, 373(6512), 335–339.
- Tsai, C. , Lo, S ., See, L. , Chen, H., Chen, R., Weng, Y ., Chang, F ., et al. (2002). Environmental risk factors of young onset Parkinson's disease: a case-control study. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 104(4), 328–333.
- Tsukahara, T., Takeda, M., Shimohama, S., Ohara, O., & Hashimoto, N. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery*, 37(4), 733–9; discussion 739–41.
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., et al. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674), 1158–60.
- Vučković, M. G., Li, Q., Fisher, B., Nacca, A., Leahy, R. M., Walsh, J. P., Mukherjee, J., et al. (2010). Exercise elevates dopamine D2 receptor in a mouse model of Parkinson's disease: in vivo imaging with [18F]fallypride. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 25(16), 2777–84.

- Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F., & Takahashi, H. (2012). The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *Molecular neurobiology*, 47(2), 495–508.
- Wang, F., Kameda, M., Yasuhara, T., Tajiri, N., Kikuchi, Y., Liang, H. B., Tayra, J. T., et al. (2011). GDNF-pretreatment enhances the survival of neural stem cells following transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience research*, 71(1), 92–8.
- Werner, C., Fürster, T., Widmann, T., Pöss, J., Roggia, C., Hanhoun, M., Scharhag, J., et al. (2009). Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation*, 120(24), 2438–47.
- Widenfalk, J., Olson, L., & Thorén, P. (1999). Deprived of habitual running, rats downregulate BDNF and TrkB messages in the brain. *Neuroscience research*, 34(3), 125–32.
- Wooten, G. F., Currie, L. J., Bovbjerg, V. E., Lee, J. k, & Patrie, J. (2004). Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 75(4), 637–639.
- Wu, D. C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., Choi, D.-K., et al. (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(5), 1763–71.
- Wu, D., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-lewis, V., Ischiropoulos, H., & Przedborski, S. (2003). NADPH oxidase mediates oxidative stress in the model of Parkinson's disease. *PNAS*, 100(10), 1–6.
- Wyss-Coray, T., & Mucke, L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*, 35(3), 419–32.
- Yang, Y., & Lu, B. (2009). Mitochondrial morphogenesis, distribution, and Parkinson disease: insights from PINK1. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 68(9), 953–963.
- Yoshi, A., & Constantine-Paton, M. (2010). Post-synaptic BDNF-TrkB Signaling in Synapse Maturation, Plasticity and Disease. *developmental neurobiology*, 70(5), 304–322.
- Yu, F., Kolanowski, A. M., Strumpf, N. E., & Eslinger, P. J. (2006). Improving Cognition and Function Through Exercise Intervention in Alzheimer's Disease. *Journal of Nursing Scholarship*, 38(4), 358–365.

- Zang, W., Kalache, S., Lin, M., Schroppel, B., & Murphy, B. (2005). MHC Class II-mediated apoptosis by a nonpolymorphic MHC Class II peptide proceeds by activation of protein kinase C. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(12), 3661–8.
- Zhang, F., Wu, Y., & Jia, J. (2011). Exercise preconditioning and brain ischemic tolerance. *Neuroscience*, 177, 170–6.
- Zhao, C., Ling, Z., Newman, M. B., Bhatia, A., & Carvey, P. M. (2007). TNF-alpha knockout and minocycline treatment attenuates blood-brain barrier leakage in MPTP-treated mice. *Neurobiology of disease*, 26(1), 36–46.
- Zhou, X., Nai, Q., Chen, M., Dittus, J. D., Howard, M. J., & Margiotta, J. F. (2004). Brain-derived neurotrophic factor and trkB signaling in parasympathetic neurons: relevance to regulating alpha7-containing nicotinic receptors and synaptic function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(18), 4340–50.
- Zigmond, M. J., Cameron, J. L., Hoffer, B. J., & Smeyne, R. J. (2012). Parkinsonism and Related Disorders Neurorestoration by physical exercise : Moving forward. *Parkinsonism and related Disorders*, 18, S147–S150.
- Zigmond, M. J., Cameron, J. L., Leak, R. K., Mirnics, K., Russell, V. a, Smeyne, R. J., & Smith, A. D. (2009). Triggering endogenous neuroprotective processes through exercise in models of dopamine deficiency. *Parkinsonism & related disorders*, 15 Suppl 3, S42–5.