



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**ROBERTA OLIVEIRA DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA LESÃO ESTRIATAL  
UNILATERAL POR 6-OHDA EM RATOS**

**FORTALEZA- CE**

**2016**

**ROBERTA OLIVEIRA DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO MODELO DE  
DOENÇA DE PARKINSON POR 6-OHDA EM RATOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Neurociência.**

**Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.**

**FORTALEZA - CE**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

- 
- C875a Costa, Roberta Oliveira da.  
Avaliação dos efeitos do exercício físico na lesão estriatal unilateral por 6-OHDA em ratos/ Roberta Oliveira da Costa. – Fortaleza, 2016.  
150 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2016.  
Área de concentração: Neurociência.  
Orientação: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.
1. Doença de Parkinson. 2. Exercício. 3. Neuroproteção. 4. Estresse Oxidativo. 5. Oxidopamina. I. Título.

---

CDD 616.833

**ROBERTA OLIVEIRA DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA LESÃO ESTRIATAL  
UNILATERAL POR 6-OHDA EM RATOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Neurociência.**

**Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte  
Universidade Federal do Ceará – (UFC)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
Universidade Federal do Ceará – UFC (Sobral)**

Dedico este trabalho ao meu amado esposo Antônio Orcini, pelo apoio e incentivo incondicionais. Aos meus filhos, Geovani Orcini e Alice Orcini.

## AGRADECIMENTO

Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer com justiça e com o devido merecimento a todos que me conduziram nesta jornada. Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por todos os momentos maravilhosos que tenho tido em minha vida. Por todos os momentos felizes e por que não os tristes? Aprendi muito com eles, valores guardei.

Aos meus pais pelo sacrifício, dedicação e por acreditarem em meus sonhos, disponibilizando os poucos recursos que tinham em prol dos meus estudos.

Ao meu amado esposo, Antônio Orcini, que esteve ao meu lado nas horas em que chorei e nas horas em que sorri, nas horas em que me lamentei e nas horas e em que demonstrei total alegria. Obrigada por seu apoio, incentivo e por fazer meus sonhos também os seus! Amo-te!

Aos meus filhos, Geovani Orcini e Alice Orcini, que, embora tão pequenos, me ensinam a cada dia a ser uma pessoa melhor.

A minha orientadora Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, pelo apoio incondicional, pela palavra sábia e inspiração diária. Suas orientações e seu apoio foram de valor inestimável. Posso apenas me expressar através da limitação de meras palavras e, com elas, lhe prestar esta humilde, mas sincera homenagem. Muito obrigada!

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais na pessoa da Dra. Gerly Anne de Castro Brito, pelas contribuições valiosas.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, pelos ensinamentos. Em especial pela professora Dra. Antoniella Souza Gomes pela dedicação, inspiração e entusiasmo no árduo ofício de ensinar.

Às professoras, Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos, Dra. Danielle Macêdo e Dra. Fca. Cléa Florenço de Sousa, por terem me acolhido com tanto carinho no Laboratório de Neurofarmacologia.

À Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar por, prontamente, ter aceitado participar da minha banca.

Aos meus companheiros e amigos, Dr. Gilberto Santos Cerqueira e Dr. José Eduardo Eduardo Ribeiro Honório, que me apresentaram e me encorajaram ao mundo da pesquisa experimental. Obrigada por tudo!

A Maria Vilani, obrigada pelos momentos compartilhados, aqueles mais difíceis em que me estendeu sua mão amiga, oferecendo sempre um amparo. É um privilégio quando temos ao nosso lado pessoas tão maravilhosas como você.

As minhas amigas, Mariana Feitosa, Dayane Pessoa e Ayane Costa, agradeço pela amizade que, gentilmente, vocês me permitiram desfrutar.

Ao bolsista do laboratório, Carlos Venícios Jatai Gadelha, pela amizade e ajuda na execução dos experimentos para a construção deste trabalho.

Ao Francisco Arnaldo Viana Lima e Kelly Rose Tavares Neves, pela amizade e contribuição na realização desta.

A todos que compõem o Laboratório de Neurofarmacologia, em especial Lena, Pedro, Katia, Ludimilla, Jalles, Germana, Caren, Patrícia Xavier, Daniel, Thiago e Michelle pelo apoio e cooperação diária, pelos ensinamentos e solicitude.

À secretária do programa de pós-graduação em Ciências Morfofuncionais Laísa Albuquerque Bandeira, pela competência, disponibilidade, ajuda e amizade.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer.”

Albert Einstein



## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa ocasionada pela perda de células dopaminérgicas na via nigroestriatal, com uma correspondente redução no conteúdo de dopamina (DA) no corpo estriado. Neste cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do exercício físico na lesão estriatal unilateral por 6-OHDA. Para este fim, foram utilizados ratos machos *Wistar* distribuídos em 4 grupos: falso operado (FO) sem exercício (S/E), falso operado (FO) com exercício (C/E), 6-OHDA sem exercício (S/E), 6-OHDA com exercícios (C/E), que receberam injeções de 6-OHDA (12 µg/2µl) ou solução salina (FO), no estriado direito através de cirurgia estereotáxica. O protocolo de exercício foi realizado durante 14 dias, por 30 min em esteira, com velocidade de 20 cm/s iniciando-se 24h após o procedimento cirúrgico. Em seguida, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e eutanasiados, as áreas cerebrais (córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HP) e corpo estriado (CE) utilizados para determinações neuroquímicas e imunohistoquímicas. Os dados foram analisados por ANOVA (*Newman-Keuls*) e considerada significativo valores de  $p < 0,05$ . Os resultados evidenciaram que o exercício físico promoveu uma diminuição significativa no número de rotações contralaterais induzidas pela apomorfina, assim como uma melhora do desempenho motor, aumento da atividade exploratória horizontal, *rearing* e diminuição do número de *grooming*, no teste de campo aberto. O exercício também reverteu os deficits de memória, quando desafiados no teste Y-maze, e reconhecimento de objeto. As concentrações de dopamina (DA) e metabólito diminuíram no corpo estriado dos grupos lesionado. Este efeito foi, em parte, revertido pelo exercício. Quanto ao estresse oxidativo, o exercício promoveu uma redução nos conteúdos de malondialdeído (MDA) e na produção de nitrito/nitrato. O exercício aumentou as concentrações de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) nos grupos com exercício, quando relacionados aos grupos sem exercício. A imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH) e transportador de dopamina (DAT) reduziram-se, de modo significativo, no grupo 6-OHDA, com relação aos lesionados e submetidos ao exercício. Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam o potencial do exercício físico como um agente modificador da DP, sendo capaz de aliviar os prejuízos motores e cognitivos em animais submetidos ao modelo experimental da DP. O exercício físico atenuou a diminuição

das concentrações de DA no estriado e aumentou significativamente as concentrações de BDNF, além de diminuir significativamente o estresse oxidativo, podendo contribuir assim, como ferramenta não farmacológica, na prevenção sendo capaz de atenuar os sintomas da DP.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson. Exercício Físico. Neuroproteção. Estresse oxidativo. 6-OHDA.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder caused by the loss of dopaminergic cells in the nigrostriatal tract, with a corresponding reduction in the contents of dopamine (DA) in the striatum. In this scenario, the present study aimed to evaluate the beneficial effects of exercise on unilateral striatal lesion with 6-OHDA. For this, we used male Wistar rats (200-250 g) divided into 4 groups: FO (without exercise), FO (with exercise), 6-OHDA (without exercise), 6-OHDA (with exercise), who received injections 6-OHDA (12 ug / 2µl) or saline (FO) in the right striatum by stereotactic surgery. The exercise was performed for 14 days, for 30 minutes at a speed of 20 cm / second beginning 24 hours after the surgical procedure. Then the animals were submitted to behavioral tests and, after that, they were euthanized and the areas of the brain (prefrontal cortex, hippocampus and striatum) were used for immunohistochemistry and neurochemical measurements. Data were analyzed by ANOVA and Tukey test (post hoc test) and considered significant at  $p < 0.05$ . The results showed that physical exercise promotes a significant decrease in the number of contralateral rotations induced by apomorphine as well as an improved engine performance, increased horizontal exploratory activity and rearing and decreased grooming number in the open field test. We also observed a reversal of memory deficits when challenged in the Y-maze and object recognition. The levels of dopamine (DA) and metabolites decreased in the striatum of the injured group and this effect was partially reversed by exercise. The results of oxidative stress showed that exercise promoted a reduction in the MDA content and production of nitrite/nitrate. Exercise increased BDNF level when related to the non-exercise group. The immunoreactivity for tyrosine hydroxylase (TH) had a significant reduction on the right (lesioned) side of striatum in the 6-OHDA group when compared to the lesioned and subjected to exercise group. Taken together, the results of this study indicate the potential of physical exercise as a DP modifier, being able to relieve the motor and cognitive deficits in animals submitted to the experimental model of PD by reducing DA depletion in the striatum, significantly increasing BDNF levels, reducing oxidative stress, providing neuroprotection and, thus, contributing to the prevention and treatment as a pharmacological tool that can alleviate the symptoms of PD.

**Key words:** Parkinson's disease. Physical exercise. Neuroprotection. Oxidative stress. 6-OHDA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Corte coronal do encéfalo mostrando o tálamo e as diferentes partes dos Núcleos da Base (NB).....	23
Figura 2 - Representação esquemática dos sistemas dopaminérgicos: nigroestriatal, mesolímbico, mesocortical e tuberoinfundibular.....	24
Figura 3 - A via dopaminérgica nigroestriatal.....	25
Figura 4 - O balanço entre as ações estimuladoras (via glutamato-Glu e acetilcolina-ACh) e inibitórias (GABA e DA-DA) mantendo o funcionamento normal do circuito neuronal e as possíveis alterações que ocorrem na DP.....	33
Figura 5 - Comparação entre as estruturas químicas da 6-OHDA (Esquerda) e da Dopamina (Direita).....	35
Figura 6 - Mecanismos de neurotoxicidade induzida por 6-OHDA.....	36
Figura 7- Esquema mostrando a via nigroestriatal do cérebro de rato.....	37
Figura 8- Aparelho estereotáxico.....	45
Figura 9 - Esteira automatizada constituída de 3 raias.....	47
Figura 10 - Representação da perda parcial de receptores de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais.....	50
Figura 11 - Aparelho <i>rotarod</i> utilizado para realização da análise comportamental.....	51
Figura 12 - Arena do teste de campo aberto dividido em quatro quadrantes iguais.....	52
Figura 13 - Y-maze utilizado para realização do teste.....	53
Figura 14 - Arena do teste reconhecimento de objeto, dividido em quatro quadrantes iguais.....	55
Figura 15 - Efeito do exercício físico sobre o comportamento rotacional (contralateral) induzido por apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	64
Figura 16 - Efeito do exercício físico sobre atividade locomotora avaliado no teste <i>rotarod</i> , em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	65
Figura 17 - Efeito do exercício físico no comportamento exploratório horizontal (número de cruzamento), avaliado no teste campor aberto em	

	ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	67
Figura 18 -	Efeito do exercício físico no comportamento exploratório vertical ( <i>rearing</i> ), avaliado no teste campo aberto, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	67
Figura 19 -	Efeito do exercício físico no comportamento <i>grooming</i> , avaliada no teste campo aberto, em rato com lesão unilateral por 6-OHDA.....	68
Figura 20 -	Efeito do exercício físico sobre a avaliação de memória operacional, no teste Y-maze, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	69
Figura 21 -	Efeito do exercício físico no teste de reconhecimento de objeto, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	70
Figura 22 -	Efeito do exercício físico no teste de concentração de lactato após aplicação do protocolo de exercício (14 <sup>o</sup> dia), em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	71
Figura 23 -	Efeito do exercício físico sobre as concentrações estriatais de DA, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	73
Figura 24 -	Efeito do exercício físico sobre as concentrações estriatais de DOPAC, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	74
Figura 25 -	Efeito do exercício físico sobre as concentrações estriatais de HVA, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	75
Figura 26 -	Efeito do exercício físico na peroxidação lipídica (TBARS) em córtex pré-frontal (CPF), em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	77
Figura 27 -	Efeito do exercício físico na peroxidação lipídica (TBARS) em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	77
Figura 28 -	Efeito do exercício físico na peroxidação lipídica (TBARS) em corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	78
Figura 29 -	Efeito do exercício físico sobre dosagem de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.	80
Figura 30 -	Efeito do exercício físico sobre dosagem de nitrito/nitrato em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	80
Figura 31 -	Efeito do exercício físico sobre dosagem de nitrito/nitrato em corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) em ratos com lesão	

unilateral por 6-OHDA.....	81
Figura 32 - Efeito do exercício físico sobre as concentrações de GSH em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	83
Figura 33 - Efeito do exercício físico sobre as concentrações de GSH em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	83
Figura 34 - Efeito do exercício físico sobre as concentrações de GSH em corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	84
Figura 35 - Efeito do exercício físico sobre atividade da AChE em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	86
Figura 36 - Efeito do exercício físico sobre atividade da AChE em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	86
Figura 37 - Efeito do exercício físico sobre atividade da AChE em corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	87
Figura 38 - Efeito do exercício físico nas concentrações de BDNF em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	89
Figura 39 - Efeito do exercício físico nas concentrações de BDNF em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	89
Figura 40 - Efeito do exercício físico nas concentrações de BDNF em corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	90
Figura 41 - Fotomicrografias representativas de neurônios imunorreativos para Tirosina Hidroxilase (TH) em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício.....	92
Figura 42 - Quantificação da imunomarcação para Tirosina Hidroxilase (TH) no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício.....	93
Figura 43 - Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunoreatividade para DAT em corpo estriado direito (CED) de	

ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício.....	95
Figura 44 - Quantificação da imunomarcação para dopamina (DAT) no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício. ....	96

### LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sítios das lesões estriatais unilaterais com 6-OHDA.....	45
Quadro 2 – Divisão dos Grupos e Protocolo de Exercício Físico.....	48
Quadro 3 – Representa�o esquemática dos efeitos do protocolo de exercício físico esteira em altera�es comportamentais de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	109
Quadro 4 – Representa�o esquemática dos efeitos do protocolo de exercício físico esteira em testes de monoamina e metabólitos de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	110
Quadro 5 – Representa�o esquemática dos efeitos do protocolo de exercício físico esteira em testes TBARS, NITRITO, GSH e AChE de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	111
Quadro 6 – Representa�o esquemática dos efeitos do protocolo de exercício físico esteira em testes de lactato e BDNF de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	112
Quadro 7 – Representa�o esquemática dos efeitos do protocolo de exercício físico esteira em imunomarca�o de TH de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	113

### LISTAS DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Grupo 1: Desenho Experimental.....	48
Esquema 2 – Grupo 2: Desenho Experimental.....	49



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
Ach	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de variância
ATC	Ácido tricloro acético
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CE	Corpo estriado
C/E	Com exercício
CED	Corpo estriado direito
CEE	Corpo estriado esquerdo
CEPA	Comitê de ética em pesquisa animal
Cm	Centímetro
COMT	Catecol O-metiltransferase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Caudado-putâmen
CPF	Córtex pré-frontal
D1	Receptor de dopamina do tipo 1
D2	Receptor de dopamina do tipo 2
DA	Dopamina
DA	Doença de Alzheimer
DAT	Transportador de Dopamina
DH	Doença de <i>Huntington</i>
DO	Densidade óptica
DOPAC	Ácido didroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
DTNB	Ditiobisnitrobenzóico
EM	Esclerose múltipla
EPM	Erro padrão da média
ERN	Espécies reativas ao nitrogênio

ERO	Espécies reativas ao oxigênio
FO	Falso operado
G	Gramma
GABA	Ácido gama amino butírico
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia
Glu	Glutamato
GP	Globo Pálido
GPI	Globo Pálido Interno
GPe	Globo Pálido Externo
GSH	Glutathiona reduzida
GPx	Glutathiona peroxidase
GSSH	Glutathiona oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HClO <sub>4</sub>	Ácido Perclórico
HC	Hipocampo
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HVA	Ácido homovanílico
Ip	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Kilograma
L-DOPA	Levodopa
MAO	Monoamina oxidase
MAO-B	Monoamina oxidase B
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malonodialdeído
Min	Minuto
Mg	Miligrama
Mg	Micrograma
ml	Mililitro
mM	Milimol
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de Sódio
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrogênio
NO <sub>3</sub>	Nitrito

μL	Microlitro
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro-piridina
NA	Noradrenalina
NAT	Transportador noradrenalina
NB	Núcleos da Base
NC	Número de cruzamento
NG	Número de <i>grooming</i>
nM	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	Nitrito
NO <sub>3</sub>	Nitrato
NR	Número de <i>rearing</i>
Pg	Picograma
OH	Radical livre hidroxila
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
PBS	Tampão fosfato-salino
Rpm	Rotações por minuto
Seg	Segundo
S/E	Sem exercício
SNC	Sistema nervoso central
SN	Substância negra
SNpc	Substância negra <i>pars compacta</i>
SNpr	Substância negra <i>pars reticular</i>
SOD	Superóxido dismutase
TB	Tris <i>buffer</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TH	Tirosina hidroxilase
VO <sub>2</sub>	Consumo de Oxigênio
VO <sub>2</sub> máx	Consumo de oxigênio máximo

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μ	Micro
®	Marca registrada
α	Alfa
β	Beta
±	Mais ou menos
≤	Menor do que

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
1.1	Doença de Parkinson.....	24
1.2	Acetilcolina e Acetilcolinesterase na Doença de Parkinson.....	29
1.3	Fisiopatologia da Doença de Parkinson.....	30
1.4	Estresse Oxidativo na Doença de Parkinson.....	32
1.5	Tratamento da Doença de Parkinson.....	32
1.6	Modelos experimentais Doença de Parkinson: 6-OHDA.....	34
1.7	Exercício Físico e Doença de Parkinson.....	40
1.8	Relevância e Justificativa.....	43
2	OBJETIVOS.....	45
2.1	Objetivo Geral.....	45
2.2	Objetivos Específicos.....	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Animais.....	46
3.2	Drogas e Reagentes.....	46
3.3	Cirurgia Estereotáxica: Injeção Estereotáxica Unilateral com 6-OHDA.....	46
3.4	Procedimento Experimental.....	48
3.4.1	<i>Protocolo de exercício físico esteira.....</i>	48
3.5	Testes comportamentais.....	49
3.5.1	<i>Teste rotacional com apomorfina.....</i>	51
3.5.2	<i>Teste rotarod.....</i>	53
3.5.3	<i>Teste de Campo Aberto (OPEN FIELD) – Atividade Locomotora Espontânea.....</i>	53
3.5.4	<i>Teste Labirinto em Y (Y- Maze) (STONE et al., 1991).....</i>	54
3.5.5	<i>Teste Reconhecimento de objeto.....</i>	56
3.6	Determinação de lactato enzimático.....	57
3.7	Dissecações das áreas cerebrais.....	58
3.7.1	<i>Áreas cerebrais para testes neuroquímicos e imunohistoquímicos.....</i>	58
3.8	Determinação da concentração de monoaminas e seus metabólitos com HPLC.....	58

3.9	Determinação da peroxidação lipídica (TBARS) (DRAPER & HADELY, 1990).....	59
3.10	Determinação de Nitrito (GREEN <i>et al.</i> , 1982).....	60
3.11	Determinação da Concentração de glutathiona reduzida (GSH) (SEDLAK & LINDSAY, 1968).....	60
3.12	Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE).....	61
3.13	Dosagem de Proteína (BRADFORD, 1976).....	62
3.14	Determinação das concentrações de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF).....	63
3.15	Análises Imunohistoquímicas.....	63
3.15.1	<i>Tirosina Hidroxilase</i> .....	63
3.15.2	<i>Transportador de dopamina (DAT)</i> .....	64
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	65
5	RESULTADOS.....	66
5.1	Efeito do exercício físico em esteira no comportamento rotacional induzido pela administração intraperitoneal de apomorfina em rato com lesão unilateral por 6-OHDA.....	66
5.2	Efeito do exercício físico em esteira sobre atividade locomotora no teste <i>rotarod</i> em ratos lesionados com 6-OHDA.....	67
5.3	Efeito exercício físico em esteira sobre o teste de campo aberto (número de cruzamentos, <i>grooming</i> e <i>rearing</i> ) em ratos lesionados com 6-OHDA.....	68
5.4	Efeito do exercício físico em esteira sobre a avaliação da memória operacional Y-maze em ratos lesionados com 6-OHDA..	71
5.5	Efeito do exercício físico em esteira no comportamento reconhecimento de objeto em ratos lesionados com 6-OHDA.....	72
5.6	Efeito do exercício físico em esteira na concentração de lactato em ratos lesionados com 6-OHDA.....	73
5.7	Determinação das concentrações de dopamina (DA) e seus metabólitos (DOPAC e HVA) nos corpos estriados direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão por 6-OHDA, submetidos ao protocolo de exercício físico esteira.....	74
5.8	Efeito do exercício físico em esteira na peroxidação lipídica	

	(TBARS) em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos lesionados com 6-OHDA.....	78
5.9	Efeito do exercício físico em esteira sobre dosagem de nitrito/nitrato em pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos lesionados com 6-OHDA.....	81
5.10	Efeito do exercício físico em esteira sobre a concentração Glutationa reduzida (GSH) em corte pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos lesionados com 6-OHDA.....	84
5.11	Efeito do exercício físico em esteira sobre determinação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos lesionados com 6-OHDA.....	87
5.12	Efeito do exercício físico em esteira nas concentrações de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos lesionados com 6-OHDA.....	90
5.13	Efeito do exercício físico em esteira sobre a imunorreatividade para a tirosina hidroxilase (TH) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA.....	93
5.14	Efeito do exercício esteira sobre a atividade do transportador de dopamina (DAT) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA.....	96
6	DISCUSSÃO.....	99
7	CONCLUSÃO.....	116
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
9	REFERÊNCIAS.....	118
	ANEXOS.....	151
	Aprovação CEPA.....	151

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson, pesquisador que publicou a monografia denominada “*An Essay on Shaking Palsy*”. Esta patologia, denominada por Parkinson como Paralisia Agitante, foi caracterizada pela presença de movimentos tremulantes involuntários, redução da força, tendência à inclinação do tronco para frente e alteração da marcha (ANDRADE *et al.*, 2010; HAUSER; ZESIEWICZ, 2001).

Parkinson faleceu em 21 de dezembro de 1824 e a repercussão de sua publicação sobre a paralisia agitante aconteceu, de forma tímida, nas décadas que se seguiram. Na literatura médica, essa doença obteve um maior conhecimento somente na segunda metade do século XIX (ANDRADE *et al.*, 2010). No início do século XX, graças aos estudos do neurologista francês Jean Charcot, os conhecimentos clínicos da doença tomaram maior impulso com a diferenciação dos distúrbios e de outras alterações do movimento, como a esclerose múltipla e a conclusão de que a bradicinesia é independente da rigidez e da presença de tremores (GOETZ, 2011).

É a segunda doença neurodegenerativa mais comum em populações idosas, trata-se de uma doença de distribuição universal, atingindo em torno de 0,1 a 0,3% da população mundial (WIRDEFELDT *et al.*, 2011). Acomete, preferencialmente, indivíduos com idade superior a 50 anos. A incidência tem aumentado em cerca de 1% em pessoas acima de 65 anos, e de 2,5%, nos indivíduos acima de 85 anos de idade. A predominância é de, aproximadamente, 550 por 100.000 aos 70 anos de idade. Contudo, estima-se que, até 2030, no Brasil 340 mil pessoas sejam acometidas pela DP (DORSEY *et al.*, 2007; GOBBI *et al.*, 2014).

Considera-se uma enfermidade progressiva que ocasiona severa incapacidade após 10 a 15 anos de desenvolvimento da doença, além de impacto social e financeiro significativamente elevado. Avalia-se que o custo anual mundial com o tratamento farmacológico esteja em torno de 11 bilhões de dólares, sendo, cerca de 3 a 4 vezes, mais caro para paciente em estágios avançados da doença (OLESEN *et al.*, 2012).

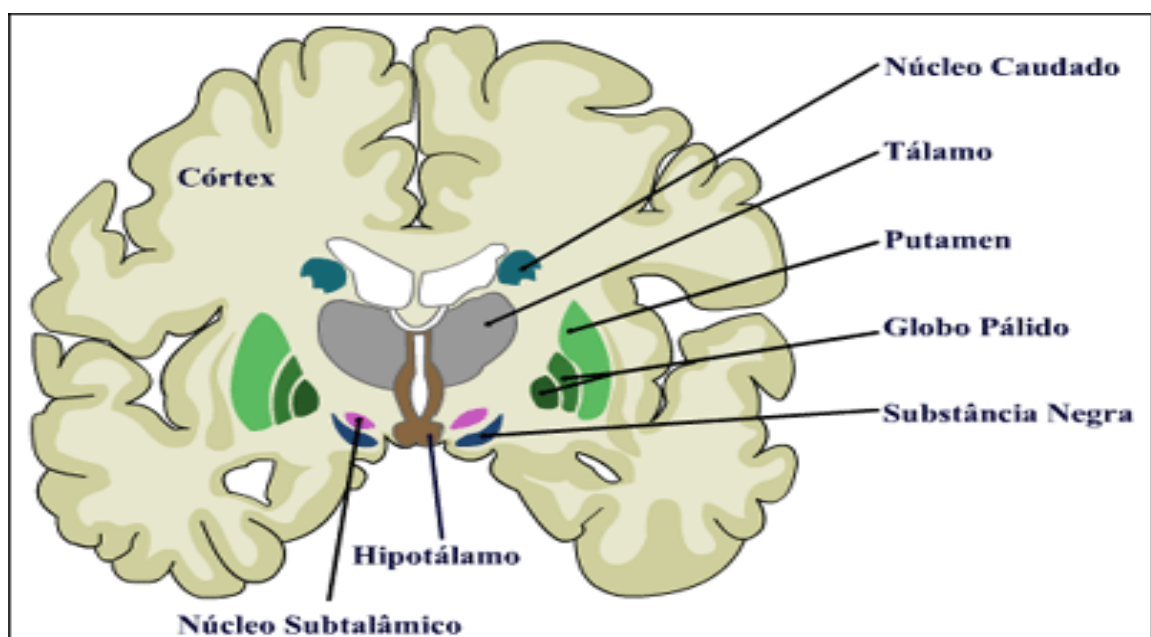


DP é uma patologia neurodegenerativa, crônica e progressiva do sistema nervoso central (SNC), ocasionada pela degeneração contínua de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNpc), situada na região da porção superior do tronco encefálico, resultando na depleção da dopamina (DA) na via nigroestriatal (HOHLEFELD *et al.*, 2015; PAIXÃO *et al.*, 2013).

Os sinais e sintomas motores da DP decorrem das alterações funcionais dos núcleos da base (NB). Assim, a DP foi a primeira do sistema nervoso (SN) a ser identificada como uma doença molecular ocasionada por um defeito característico no metabolismo de um neurotransmissor, neste caso a DA produzida pelos neurônios situados na SNpc (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003).

Os NB são compostos por uma complexa rede de núcleos e vias nervosas. Participam do planejamento de movimentos voluntários, estando envolvidos no controle das funções cognitivas e afetivas. Fazem parte dos NB o corpo estriado (CE) - núcleos caudado e putâmen (CP), o globo pálido (GP) que se situa medialmente ao CE e está dividido em uma porção interna (GPI) e externa (GPe), a substância negra (SN) situada no mesencéfalo e dividida em duas porções: a parte reticular (SNpr) e a parte compacta (SNpc) e núcleo subtalâmico (Figura 1) (BEAR *et al.*, 2002; GOBBI *et al.*, 2014).

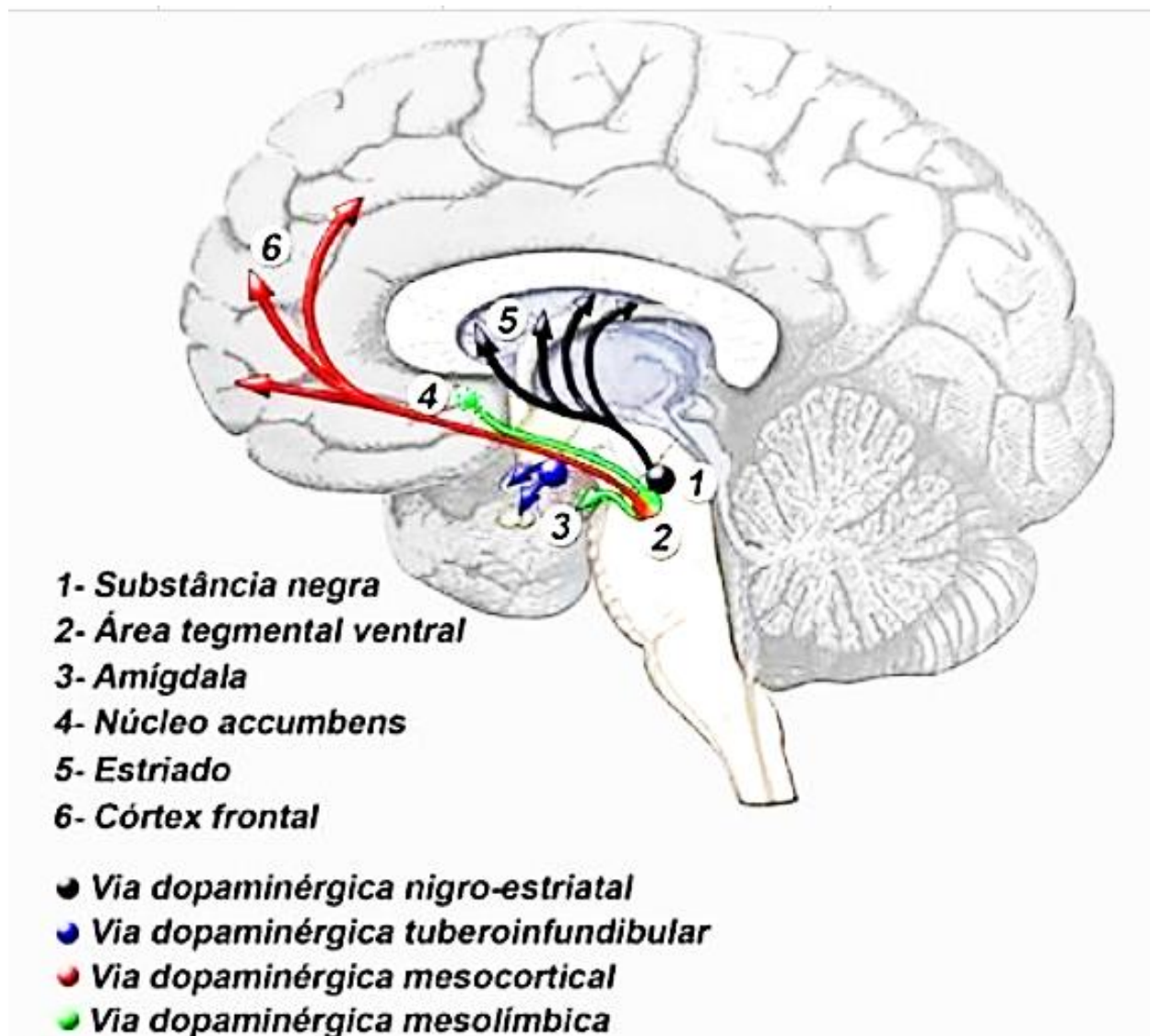
Figura 1 – Corte coronal do encéfalo mostrando o tálamo e as diferentes partes dos Núcleos da Base (NB)



Fonte: <http://www.virtual.unifesp.br/unifesp/apoptose/restrito/ganglios.gif>

A SN é composta por uma área rica em pigmentos denominada *pars reticulata*. Os neurônios da SNpc são responsáveis pela produção da dopamina, enquanto que SNpr produz GABA (ácido gama aminobutírico) (HAUSER; ZESIEWICZ, 2001). A DA representa cerca de 80% do conteúdo de catecolaminas no cérebro. Projeções originárias de áreas cerebrais que sintetizam este neurotransmissor originam quatro vias axonais: Nigro-estriatal, mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular (Figura 2) (AGUIAR, L., 2009).

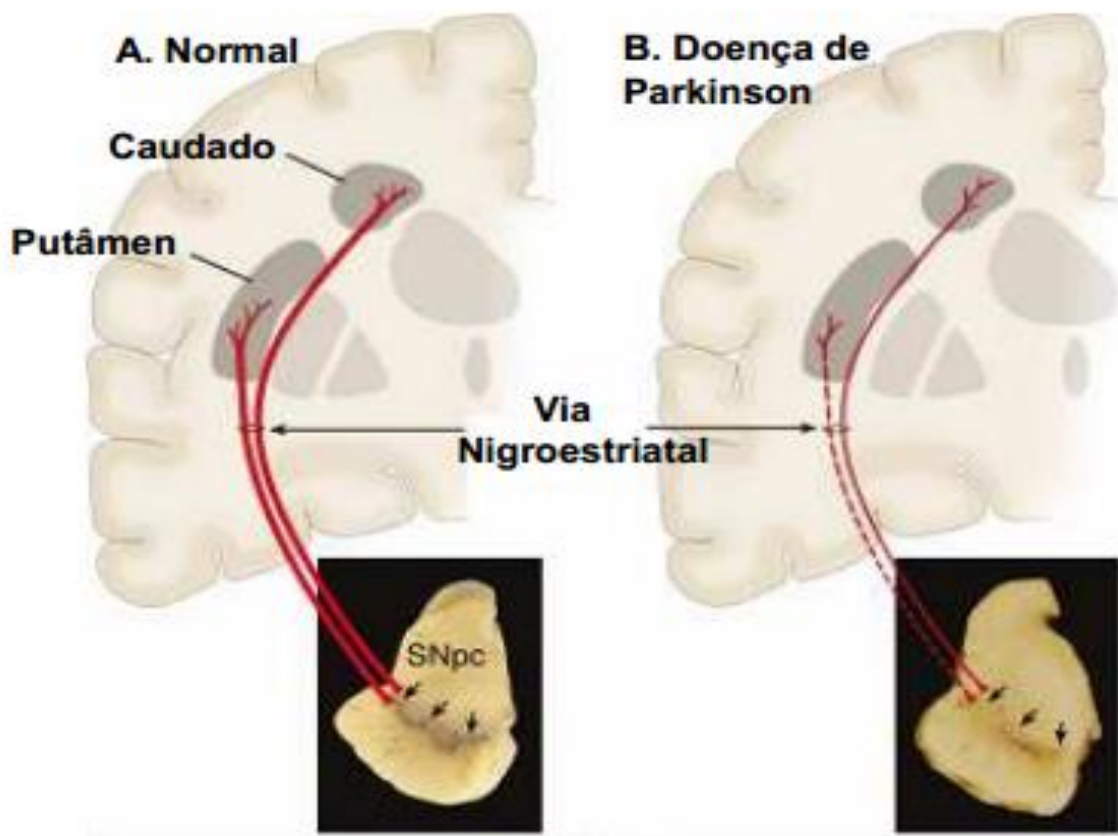
Figura 2 – Representação esquemática dos sistemas dopaminérgicos: nigroestriatal, mesolímbico, mesocortical e tuberoinfundibular.



Fonte: <http://pacotraver.files.wordpress.com/2012/04/dopamina.png>

As projeções que constituem a via dopaminérgica nigroestriatal surgem de células da SNpc, cujos axônios terminam no CE, onde ocorre a liberação de DA (Figura 3). DP apresenta efeitos opostos nas células, sendo excitatórios nas células da via direta e inibitório nas células da via indireta (OBESO *et al.*, 2008). Desta forma, a DA funciona como um modulador dos NB, pois, quando liberada no CE, facilita o movimento (KANDEI; SCHWARTZ; JESSEL, 2003). Isso explica a lentidão de movimentos e a rigidez muscular na DP, visto que a degeneração dos neurônios nigroestriatais causa a redução da concentração de DA no CE e, conseqüentemente, distúrbios de movimento (OBESO *et al.*, 2008; STOCCHI, 2009).

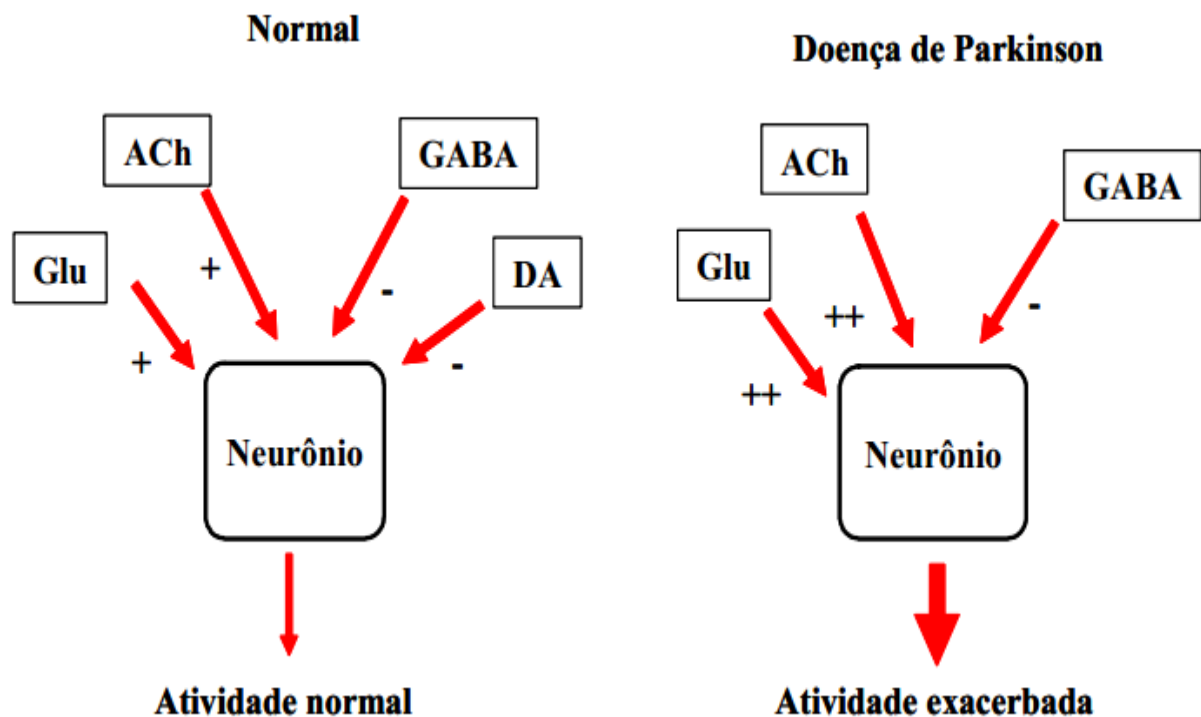
Figura 3 – Representação da via dopaminérgica nigroestriatal.



A via dopaminérgica nigroestriatal é composta por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na SNpc e projetam seus axônios para o caudado-putâmen, ou corpo estriado (CE). Representação esquemática: Indivíduo normal (A), Doença de Parkinson (B). Fonte: Adaptado (DAUER; PRZEDORSKI, 2003).

Neste circuito, além da DA, outros neurotransmissores também possuem papel fundamental, como o GABA, a acetilcolina (ACh), o glutamato (Glu), a encefalina, entre outros. As concentrações de ACh não se alteram na DP, mas, com a depleção da DA, ocorre redução do efeito inibitório da DA nos neurônios do CE ricos em ACh, levando a uma hiperatividade relativa desses neurônios colinérgicos (Figura 4) (XU; BATISTA; SCHWARZSCHILD, 2005).

Figura 4 – O balanço entre as ações estimuladoras (via glutamato-Glu e acetilcolina-ACh) e inibitórias (GABA e DA) mantendo o funcionamento normal do circuito neuronal e as possíveis alterações que ocorrem na DP.



Fonte: AGUIAR, L., 2009.

A redução de DA no CE apresenta também como resultado a diminuição dos níveis de seus metabólitos, ácido homovanílico (HVA) e 3,4- dihidroxifenilacético (DOPAC) (LANG; LOZANO, 1998). Observa-se também a redução da atividade de enzimas envolvidas na síntese de DA, como a tirosina hidroxilase (TH) e dopa descarboxilase (BEAL, 2001; GERLACH; RIEDERER, 1996). Entretanto, a neuropatologia da DP não está restrita unicamente à via nigroestriatal, de forma que são observadas anomalias histológicas em outros grupos celulares dopaminérgicos

e não dopaminérgicos. Acredita-se que alterações em outros neurotransmissores, principalmente noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e acetilcolina (ACh), estejam associadas ao amplo espectro de sintomas motores e não motores nos pacientes com DP (AGUIAR JUNIOR, 2011; TADAIESKY, 2010).

## 1.2 Acetilcolina e Acetilcolinesterase na Doença de Parkinson

O sistema colinérgico é fundamental em muitas funções vitais do organismo, sendo a acetilcolina (ACh) o neurotransmissor que desempenha funções muito importante. A ACh é uma molécula orgânica, liberada nas terminações nervosas como neurotransmissor. Nos neurônios colinérgicos, a ACh é produzida pela enzima colina acetiltransferase que usa acetilcoenzima-A e colina como substrato para sua formação (ELDEEN; ELGORASHI; VAN , 2005). No sistema nervoso periférico, ela é liberada por todos os neurônios motores do sistema nervoso somático e, no sistema nervoso autônomo, por todos os neurônios pré-ganglionares, além dos neurônios pós-ganglionares do sistema nervoso parassimpático e dos pós-ganglionares que inervam as glândulas sudoríparas, pertencentes ao sistema nervoso simpático (MOTA *et al.*, 2012; RANG H *et al.*, 2004).

No sistema nervoso central, o neurotransmissor ACh está relacionada ao processo cognitivo (atenção, aprendizado e memória) na recompensa e motivação, no processamento de estímulos, na participação no processo de sono e vigília, na organização cortical do movimento e no controle do fluxo sanguíneo cerebral (MESULAM *et al.*, 2002; MORETTO *et al.*, 2004). Tem sido estudado o papel da ACh no comportamento emocional, e algumas evidências sugerem que uma disfunção na transmissão colinérgica pode estar envolvida em sintomas patológicos depressivos, deste modo, problemas no neurotransmissores como a acetilcolina podem levar a doenças neurodegenerativas.

Após a liberação da ACh na fenda sináptica ou junção neuromuscular ela se liga à receptores específicos que podem ser nicotínicos (canais iônicos) ou muscarínicos (associados a proteína G), e sofre hidrólise pelas enzimas colinesterases. Estas enzimas desempenham papel importante na neurotransmissão colinérgica central e periférica, além de outras funções, como a hidrólise e detoxificação de xenobióticos (MASSOULIÉ *et al.*, 1993).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima cuja ação é crucial na propagação do impulso nervoso. A AChE é uma serina hidrolase que desempenha um papel essencial no mecanismo colinérgico, catalisando a hidrólise natural do substrato acetilcolina em acetato e colina. A acetilcolina é sintetizada e armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico, sendo que a liberação depende de alterações iônica e elétrica da membrana plasmática (MOTA *et al.*, 2012; SOUZA, 2011). Acetilcolinesterase (AChE) hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, e a butirilcolinesterase hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. Ambas as colinesterases são amplamente distribuídas no organismo (TAYLOR *et al.*, 1999). A AChE é encontrada no sistema nervoso central em regiões como hipotálamo, substância negra, estriado, hipocampo, cerebelo e também no fluido cérebro espinhal (RANG *et al.*, 2004). Esta enzima é secretada nas terminações nervosas, sendo esta taxa de secreção modulada pela estimulação neuronal, pelo nível de neurotransmissor na fenda sináptica, bem como, pelo tratamento com drogas (DESCARRIES; GISIGER; STERIADE, 1997).

A atividade total da AChE nos tecidos neurais apresenta variações entre diferentes regiões do SNC, sendo maior nas estruturas subcorticais telencefálicas (núcleo caudado e núcleo de Meynert); intermediária na substância negra, cerebelo e medula espinhal, e menor no fórnix e regiões corticais (hipocampo, córtices temporal e parietal) (JOHN, *et al.*, 1986).

A inibição da enzima AChE leva ao um aumento das moléculas de acetilcolina nas sinapses, melhorando os sintomas cognitivos, comportamentais e funcionais relacionados às demências hipocolinérgicas, em doenças neurodegenerativas como como a doença de Alzheimer (GOMES; KOSZUOSKI, 2005). Portanto torna-se necessário estudos para uma melhor compreensão AChE na doença DP.

### **1.3 Fisiopatologia da Doença de Parkinson**

O processo neurodegenerativo da SNpc envolvida na DP é marcado pela deficiência de TH e presença de inclusões intracitoplasmáticas ricas em corpos de Lewy. A perda neuronal dopaminérgica se inicia na camada ventrolateral da substancia negra, avançando para as camadas medial, ventral e dorsal. Esse

padrão de perda está relacionado à diminuição de transportadores de DA (PEREIRA *et al.*, 2007).

Esse evento de morte neuronal é desencadeado por inúmeros fatores que compõem um cenário ainda pouco compreendido. Porém, um dos achados fisiopatológicos mais frequentes na DP é a presença de inclusões citoplasmáticas nucleares chamadas de corpúsculos de Lewy (ANDRADE *et al.*, 2010; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; TOGO *et al.*, 2001), já mencionados anteriormente e formados, principalmente, pela proteína neural  $\alpha$ -sinucleína (KOO; LEE; IM, 2008; TAKAHASHI; WAKABAYASHI, 2001; WEINTTRAUB; COMELLA; HORN, 2008). Esses agregados proteicos se acumulam nos neurônios, onde, ao ultrapassar um determinado limiar, acarretam neurotoxicidade com consequente morte neuronal e concomitante redução da aferência dopaminérgica para o CE.

Deste modo, degeneração progressiva da via nigroestriatal é o mediador predominante para as manifestações clínicas da DP, incluindo rigidez muscular, tipo plástica ou cética, tremor de repouso, bradicinesias, que se traduzem por lentidão dos movimentos e dificuldade em iniciar movimentos voluntários, e instabilidade postural por perda de reflexos posturais, podendo também apresentar disfunções não motoras (FERNANDEZ, 2012; GUERRERO *et al.*, 2013; JANKOVIC, 2008; MOSLEY *et al.*, 2006).

Os sintomas motores causam maiores dependência e redução na qualidade de vida (MARTINEZ; MARTIN, 2006). Tais sintomas costumam aparecer primeiro em um dos lados do corpo, evoluindo, posteriormente, para o outro de acordo com o avanço da doença (HAWKES *et al.*, 2010). Contudo, cada paciente pode ou não manifestar todos os sintomas, sendo que 30% não chegam a apresentar o mais clássico deles, tremor de repouso (OLANOW; STERN; SETHI, 2009).

Além dos sintomas motores, evidências crescentes sugerem que a DP apresenta diversos sintomas não motores como: os neuropsiquiátricos, distúrbios do sono, sintomas autonômicos e sensoriais. Estes foram encontrados no estágio avançado e precoceda doença, podendo anteceder o aparecimento de sintomas motores. Tendo em vista esta teoria, existe uma tendência a novos estudos em busca de fenótipo da fase não motora, sugerindo que estes podem ser considerados fatores de risco para o desenvolvimento da DP, bem como um indicativo para o diagnóstico formal (ANDRADE *et al.*, 2010; WEINTTRAUB; COMELLA; HORN, 2008).

É importante ressaltar que disfunções cognitivas podem ser encontradas em todos os estágios da doença. Nas etapas iniciais e intermediárias, incidem déficits moderados, enquanto nas fases avançadas relata-se demência em 11 a 36% dos pacientes (GILADI *et al.*, 2000). O acometimento das funções cognitivas na DP se deve, provavelmente, a uma disfunção das conexões fronto-estriatais (BRANDT *et al.*, 2004).

Os sinais da DP geralmente têm progressão lenta e a confirmação do diagnóstico pode levar muitos meses e até anos, após o aparecimento dos primeiros sintomas motores. Diversos estudos ressaltam que, no momento em que os sinais motores ultrapassam o limiar de detecção clínica, uma quantidade significativa dos neurônios dopaminérgicos já foram degenerados. Assim, os sintomas clássicos da DP se manifestam após perda de 70-80% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, levando a uma grande redução nos níveis de DA estriatais (BRAAK *et al.*, 2004; LEVY; AGELADA; GREENE, 2009; MAYO *et al.*, 2005). O fato do processo neurodegenerativo já se encontrar num estágio muito avançado quando o diagnóstico é estabelecido pode ser responsável pela baixa efetividade do tratamento farmacológico.

Apesar dos avanços da medicina e da investigação científica nesta área, a etiologia da DP continua ainda por esclarecer, a maioria dos casos apresenta, portanto, etiologias multifatoriais, com a presença de componentes genéticos e ambientais (SULZER, 2007). Evidências indicam que possíveis mecanismos como, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, deficiência de fatores neurotróficos, ação do sistema imune, acúmulo de proteínas alteradas, excitotoxicidade e mecanismo pró-apoptótico estejam certamente relacionados à etiologia da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; GOBBI *et al.*, 2014; HOSAMANI; KRISHNA; MURALIDHARA, 2014; PARK *et al.*, 2014; SCHAPIRA, 2010; TAMILSELVAM *et al.*, 2013).

#### **1.4 Estresse Oxidativo na Doença de Parkinson**

Os radicais livres são moléculas altamente reativas compostas a partir de transferências de elétrons. Deste modo, podem reagir e formar outra série de espécies reativas, como as espécies reativas do oxigênio (EROs) e, se não



neutralizadas, podem levar ao estresse oxidativo, exacerbar a inflamação e promover dano tecidual.

O dano oxidativo ocorre nos organismos celulares devido ao desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e as defesas antioxidantes celulares. Através da respiração celular normal ou da respiração mitocondrial desregulada com um desequilíbrio no complexo I mitocondrial, grandes quantidades de EROs podem ser produzidas e desencadearem efeitos deletérios no delicado equilíbrio neuronal do SNC, que é especialmente sensível a eventos geradores de estresse oxidativo em razão das suas características fisiológicas e anatômicas (BRAGA, 2008). Deste modo, o estresse oxidativo está realmente implicado como sendo a principal causa da injúria neuronal em várias doenças neurológicas, incluindo a DP, no entanto, ainda não está claro se o estresse oxidativo é causa ou consequência dessas doenças (ALFAVARO *et al.*, 2004; MOSLEY *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2014; SCHAPIRA; JENNER, 2011).

Essas espécies químicas são abundantes na natureza, produzidas normalmente no metabolismo celular e encontradas no meio ambiente, facilmente formadas com exposição excessiva à luz solar, poluição, álcool, inseticidas, radiação, exercício intenso, etc. Existem enzimas antioxidantes protetoras e mecanismos que neutralizam os radicais livres, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione peroxidase (GPx) e redutase (GSH), a vitamina E, a vitamina C e outras substâncias capazes de inativar ou reduzir a formação dos radicais livres (MOSLEY *et al.*, 2006).

Normalmente, as EROs são decompostas e eliminadas pelos sistemas de defesa celular, mantendo-se, assim, presentes transitoriamente e em baixos níveis sem causar danos às células. Quando a sua produção aumenta ou quando os sistemas de defesa são ineficientes para a remoção, o resultado é um excesso de EROs, que leva a uma condição denominada de estresse oxidativo (NELSON; COX, 2014; THAKUR; NEHRU, 2014), podendo ocorrer o rompimento de membranas lipídicas e a oxidação de proteínas citoplasmáticas (BUTTERFIELD; BADER LANGE; SULTANA, 2010; HOSAMANI; KRISHNA; MURALIDHARA, 2014).

Inúmeros estudos em tecidos cerebrais *post-mortem* de pacientes com DP têm evidenciado a presença de altos níveis de peroxidação lipídica, depleção de GSH e elevada oxidação proteica. Dessa forma, sugeriu-se que EROs e espécies

reativas de nitrogênio (ERN) estão envolvidas na degeneração de neurônios dopaminérgicos (MAETZLER *et al.*, 2011; TSANG; CHUNG, 2009).

### 1.5 Tratamento da Doença de Parkinson

O caráter progressivo da DP e suas manifestações clínicas (motoras e não-motoras), agregados a implicações colaterais precoces e tardios da intervenção terapêutica, tornam o tratamento farmacológico desafiador. A medida que ocorrem a progressão da doença e aparecimento de novos sintomas aumentam resposta à terapia farmacológica decresce (MORRISH *et al.*, 1998).

Atualmente, o tratamento se limita apenas ao alívio sintomático porque, até o presente momento, não existem agentes capazes de inibir a degeneração neuronal. Esses, inicialmente, levam a uma melhora expressiva dos sinais e sintomas. A medida que a doença progride, os medicamentos perdem sua eficácia e eficiência, tornando-se necessário um aumento das doses e a substituição ou a combinação terapêutica para minimizar os efeitos causados pela doença. Outro fator limitante relacionado ao tratamento atual são os efeitos adversos, os quais acabam por impossibilitar a continuação da terapêutica (XU; BASTIA; SCHWARZSCHILD, 2005).

Deste modo, existem hoje várias formas de intervenção farmacológica sintomática: drogas que aumentam a produção endógena de DA (como a levodopa – L-Dopa, em geral utilizada juntamente com inibidores da dopa descarboxilase de ação periférica); agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, pergolida); drogas que previnem a degradação endógena da DA (inibidoras da monoamina oxidase B (MAO-B) como a selegilina); inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT): tolcapone e entacapone; antiglutamatérgicos (amantadina) e antagonistas colinérgicos (benztropina) (AGUIAR, L., 2009; ANDRADE, 2006).

No momento, a L-Dopa é a droga mais efetiva no tratamento da DP, sendo reconhecida como “padrão ouro” (NAGATSUA; SAWADAB, 2009; NEVES, 2014). Por ser uma amina precursora de DA, oralmente ativa e absorvida no intestino delgado é prontamente descarboxilada pela enzima dopa descarboxilase, e somente uma pequena quantidade chega inalterada no SNC. A meia vida plasmática da L-Dopa é extremamente curta, não passando de 90 minutos. Portanto, altas doses se tornam imprescindíveis, o que acarreta consequências colaterais como

vômitos e náuseas. Para bloquear os efeitos periféricos da DA e aumentar a biodisponibilidade da L-Dopa, ela é coadministrada com a carbidopa ou a benzerazida, que são inibidores da descarboxilase do ácido amino aromático (DDC) (PETZINGER *et al.*, 2007). Estes inibidores não atravessam a barreira hematoencefálica, aumentando a conversão central de L-Dopa (SCHEFFER, 2013).

A terapia com a L-Dopa é altamente efetiva durante os primeiros estágios do tratamento, no entanto, quando prolongado, os pacientes passam a apresentar o fenômeno *ON/OFF*, que são flutuações do estado clínico, caracterizado por movimentos coreoatetóticos nas extremidades e segmento cranial, manifestando-se no auge do efeito da L-Dopa, a discinesia – *ON*. A discinesia é uma implicação grave caracterizada por movimentos involuntários que atingem aproximadamente 50% dos pacientes (normalmente após 3-5 anos) (KALINDERI *et al.*, 2011). Por outro lado, a redução na dose de L-Dopa pode levar a movimentos distônicos, na região axial e também nas extremidades, sendo acompanhados de dor no segmento acometido (HOLLOWAY *et al.*, 2004; JENNER, 2005; RODRIGUES; CAMPOS, 2006). Tendo-se em vista as opções terapêuticas limitadas para o tratamento de DP, drogas neuroprotetoras estão atualmente sendo estudadas, com a finalidade de tornar mais lenta a progressão da doença. Assim, várias drogas que têm como alvos estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação são candidatos primordiais como neuroprotetores. Muitas destas drogas já estão sendo submetidas a ensaios clínicos (SEIDI; POTASHKIN, 2011).

Portanto, torna-se essencial o desenvolvimento de novos tratamentos e terapias que melhorem a sintomatologia da DP com efeitos colaterais reduzidos. Acredita-se que o tratamento ideal seria aquele em que se pudesse aliar a terapêutica convencional às drogas que evitassem o desenvolvimento e avanço da doença, como os neuroprotetores (AGUIAR, L., 2009). Estratégias neuroprotetoras estão sendo propostas à medida que o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da DP são esclarecidos.

## **1.6 Modelos experimentais da Doença de Parkinson: 6-OHDA**

Para tornar possível o entendimento da fisiopatologia da DP, assim como o desenvolvimento de novos tratamentos, é imprescindível a utilização de modelos animais, a fim de que sejam desenvolvidos fármacos e estratégias terapêuticas. É

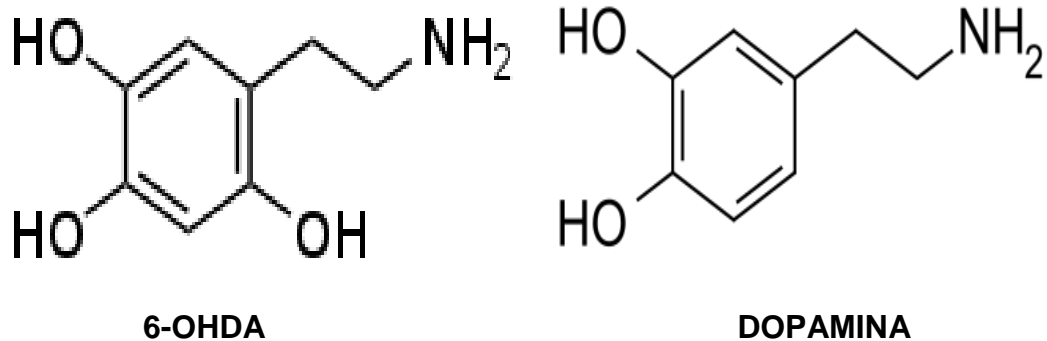
importante destacar que muitos dos progressos conseguidos até o momento pelos cientistas, na terapêutica, bem como compreensão da fisiopatologia da DP, foram possíveis devido à utilização de modelos animais (NEVES, 2014).

Modelos animais, por definição, refletem as características da doença presente no homem, simulando as mudanças patológicas, histológicas e bioquímicas da doença, assim como seus distúrbios funcionais (GERLACH; RIEDERER, 1996; DECRESSAC *et al.*, 2012). Embora não exista um modelo animal ideal da DP que ofereça todas as características agregadas à condição clínica, como: detecção das alterações motoras associadas ao parkinsonismo; perda seletiva e gradual dos neurônios dopaminérgicos com o avanço da idade; produção de inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy), eles têm sido importantes no esclarecimento dos mecanismos moleculares relacionados à neurodegeneração verificada na DP (SHIMOHAMA *et al.*, 2003).

Deste modo, foram desenvolvidos modelos animais, através da administração de agentes neurotóxicos que interrompem ou destroem seletivamente o sistema catecolaminérgico, tais como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), a metanfetamina, a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (GERLACH; RIEDERER, 1996; KAHLE *et al.*, 2002). Alguns agentes químicos como a rotenona e o paraquat, quando administrados sistemicamente, podem induzir aspectos peculiares da doença (BETARBET *et al.*, 2002; HALBACH; SCHOBBER; KRIEGLSTEIN, 2004).

A neurotoxina 6-OHDA é amplamente empregada como modelo animal para o estudo da DP, possui grande semelhança estrutural com catecolaminas, sendo, dessa maneira, tóxica aos neurônios catecolaminérgicos (BREESE; TRAYLOR, 1971). A 6-OHDA é bastante útil e de grande valia para o estudo dos mecanismos e possíveis terapias farmacológicas da doença. Foi o primeiro composto a ser encontrado com a capacidade de induzir morte seletiva em células catecolaminérgicas (UNGERSTEDT, 1968). É uma toxina seletiva para neurônios dopaminérgicos (Figura 5). Representando uma das neurotoxinas mais habitualmente utilizadas em modelos de degeneração de projeções catecolaminérgicas centrais, incluindo o sistema nigroestriatal, *in vivo* e *in vitro* (SCHOBBER, 2004). Trata-se de um composto muito instável que é facilmente oxidado para produzir espécies reativas de oxigênio, as quais poderão causar a morte dos neurônios dopaminérgicos por apoptose.

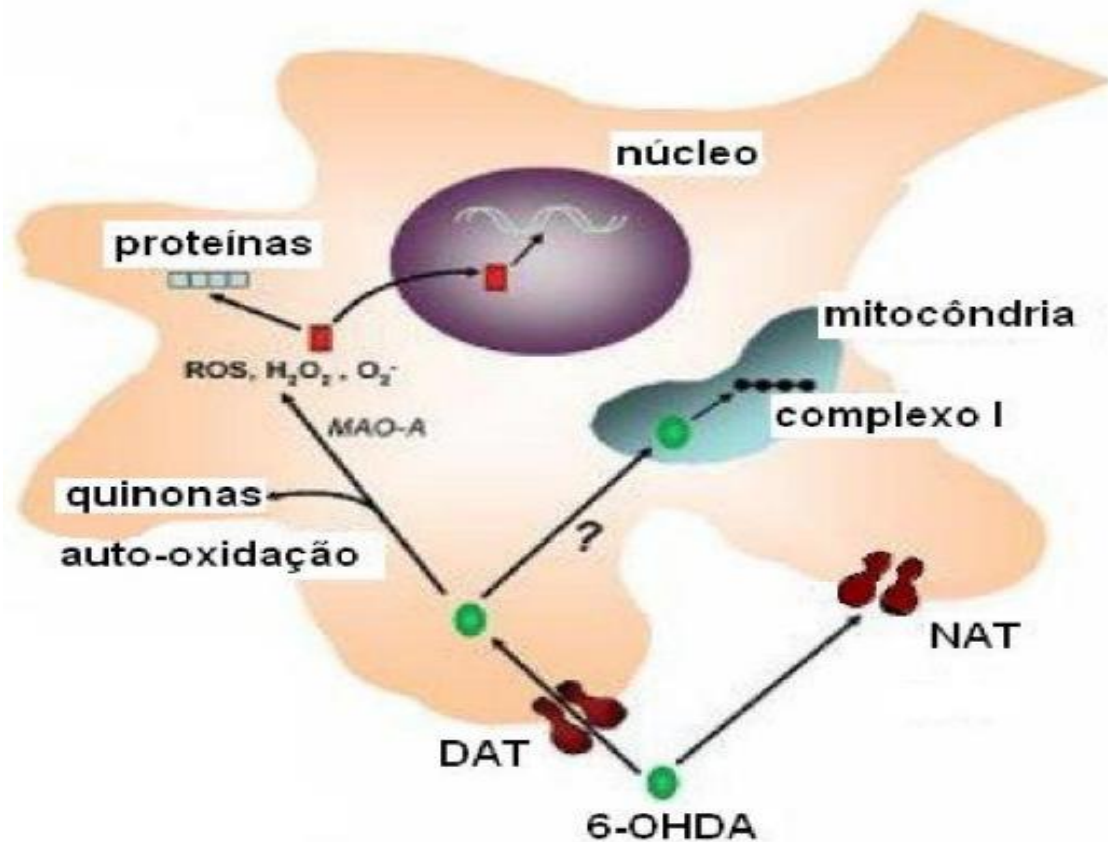
Figura 5 – Comparação entre as estruturas químicas da 6-OHDA (Esquerda) e da Dopamina (Direita).



Fonte: BOVÉ; PERIER, 2012.

Uma vez infundida diretamente no cérebro, a 6-OHDA produz espécies citotóxicas através de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (CHOI *et al.*, 1999), utilizando um sistema transportador de DA e NA (DAT e NAT, respectivamente) que reconhece e capta a 6-OHDA (LINDGREN; LELOS; DUNNET, 2012). Os principais danos neuronais são causados pelo aumento de EROs no interior do neurônio, originados através da oxidação da 6-OHDA pela enzima MAO e de eventos de auto-oxidação, nos quais os produtos gerados são peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), radicais livres tipo hidroxila (OH<sup>-</sup>) e quinonas que são produzidas em sua metabolização, resultando, assim, em morte neuronal (KABUTO; YAMANUSHI, 2011). Estudos também demonstram neurotoxicidade por alteração da função mitocondrial, agindo no complexo I da cadeia transportadora de elétrons (Figura 6) (SIMOLA; MORELLI, 2007).

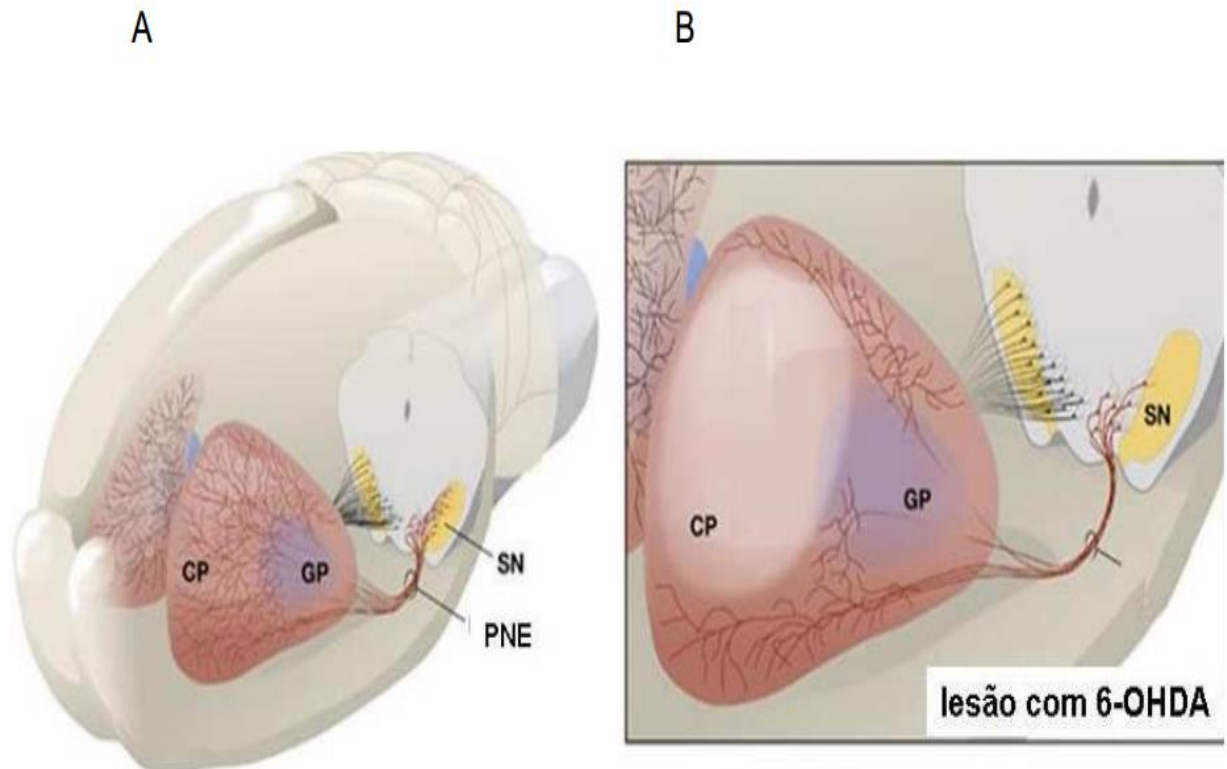
Figura 6 – Mecanismos de neurotoxicidade induzida por 6-OHDA.



Após sua captação por DAT ou NAT, a 6-OHDA entra nos neurônios catecolaminérgicos e é degradada enzimaticamente pela MAO ou auto-oxidada, gerando espécies citotóxicas que danificam proteínas e ácidos nucleicos, induzindo ao dano neuronal. Além disso, a 6-OHDA pode levar à neurotoxicidade através da disfunção do complexo mitocondrial I. Fonte: Adaptado (SIMOLA; MORELLI, 2007).

A magnitude da lesão é dependente da quantidade de 6-OHDA injetada e do local da aplicação. Para injeção intracerebral com 6-OHDA existem duas formas: diretamente na SN, levando a uma morte rápida das células (um a três dias) ou através da injeção no CE, que ocasiona degeneração retrógrada dos neurônios da SN. Esse último modelo causa uma lesão lenta, parcial e progressiva das células neuronais, por volta de quatro semanas e tem sido utilizada com sucesso na finalidade de mimetizar a lesão lenta e progressiva do sistema nigroestriatal (Figura 7) (SHIMOHAMA *et al.*, 2003). Fato esse que reproduz de maneira mais próxima a progressão da DP, viabilizando, assim, a investigação de tratamentos neuroprotetores (GEORGIEVSKA *et al.*, 2002).

Figura 7 - Esquema mostrando a via nigroestriatal do cérebro de rato.



(A) Encéfalo de rato não lesionado com as projeções dos neurônios dopaminérgicos partindo da SN em direção ao corpo estriado (ou caudado-putâmen) e globo pálido em ambos os hemisférios. (B) Após lesão unilateral com 6-OHDA, ocorre significativa redução das projeções nigroestriatais e consequente redução dos níveis de dopamina no corpo estriado, caudado-putâmen (CP), globo pálido (GP), projeções nigroestriatais (PNE); substância negra (SN). FONTE: Adaptado (KIRIK *et al.*, 2004).

A injeção bilateral de 6-OHDA na SNpc ou em outras regiões cerebrais desenvolve uma elevada mortalidade neuronal, principalmente dos neurônios catecolaminérgicos (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008). A 6-OHDA é usualmente injetada unilateralmente na via nigroestriatal, apresentando comportamento estereotipado, que são rotações contralaterais em relação ao lado lesionado devido ao desbalanço fisiológico entre o CE lesionado e o não-lesionado, quando tratados com agonistas D1/D2 da DA, como a apomorfina (BETARBET *et al.*, 2002; KIN *et al.*, 1998). Esse comportamento pode ser explicado pela superexpressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesionada do CE e representa o modelo conhecido como “hemiparkinsoniano” (PERESE *et al.*, 1989).

Nesse modelo de rotação, a administração de apomorfina é o teste padrão da literatura para verificar a estimulação de receptores dopaminérgicos. A apomorfina foi o primeiro agonista dopaminérgico a ser usado na terapia da DP. Esta droga atua sobre os receptores dopaminérgicos D1 e D2 e, em doses menores, age sobre o autorreceptor pré-sináptico, inibindo o *turnover* de DA (DELEU; NORTHWAY; HANSSENS, 2002; LABANDEIRA; GARCIA *et al.*, 1996).

### 1.7 Exercício Físico e Doença de Parkinson

A relação entre o exercício físico e a saúde vem se consolidando nos últimos anos. Em estudos clínicos de ampla abordagem epidemiológica, demonstrou-se que a prática regular de exercício físico está associada à promoção da saúde e à prevenção de doenças (LEANDRO *et al.*, 2007). Está bem estabelecido que atividade física insuficiente, ou sedentarismo, é um importante fator de risco para obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* do tipo 2, entre outras condições crônicas (PAFFENBARGER *et al.*, 1993). A falta de atividade física também tem sido relacionada com disfunções no sistema autoimune, doenças pulmonares e alterações músculo esqueléticas, alguns tipos de câncer e, mais recentemente, como fator de risco para doenças neurodegenerativas (TREJO *et al.*, 2002; VILLAR-CHEDA *et al.*, 2009).

Além disso, nas últimas décadas, os efeitos benéficos da atividade física sobre o sistema nervoso central (SNC) têm sido evidenciados, sugerindo um papel protetor contra uma variedade de distúrbios psicológicos e neurológicos (HILLMAN; ERICKSON; KRAMER, 2008; VAN PRAAG, 2009). Portanto, o exercício físico se mostrou benéfico em uma série de modelos de doenças do SNC como: Esclerose Múltipla (EM), doença de *Huntington* (DH), Alzheimer (DA), epilepsia e Parkinson (DP) (ARIDA *et al.*, 1999; BENEDETTI *et al.*, 2009; KOHL *et al.*, 2007; LAURIN *et al.*, 2001; TILLERSON *et al.*, 2003). Apesar disso, os mecanismos subjacentes a estas decorrências benéficas ainda são pouco compreendidos.

O exercício pode ser definido como atividade planejada e estruturada que causa aumento do gasto energético e da frequência cardíaca, cujo objetivo é melhorar um ou mais aspectos da aptidão física (ACSM, 2003; GOMES *et al.*, 2012). Inicialmente, ocasiona ao organismo um desequilíbrio da homeostase, uma vez que implica no aumento instantâneo da demanda energética da musculatura exercitada



e, conseqüentemente, do organismo como um todo (BRUM *et al.*, 2004). O exercício físico envolve grande consumo de adenosina trifosfato (ATP), cuja magnitude depende da intensidade do trabalho a ser realizado (HOPPELER *et al.*, 1999; ROBERGS; GHASVAND; PARKER, 2004). No que se refere ao exercício do tipo aeróbico, ocorre aumentado consumo de oxigênio pelos tecidos ( $VO_2$ ), sendo regulado pela capacidade máxima dos sistemas pulmonar e cardiovascular na captação e no transporte do oxigênio ( $VO_{2MÁX}$ ) para os tecidos (BOWEN; CARMER, 1926; LOMBARDO *et al.*, 1953), assim como a capacidade de utilização para a oxidação de substratos energéticos, como lipídeos e carboidratos (HAVEL; NAIMARK; BORCHEGREWINK, 1963). O caráter aeróbico possui um importante papel no melhoramento da aprendizagem, bem como na memória de curto e longo prazo em doenças neurodegenerativas, dentre as quais a DP (CASSILHAS *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2011).

A determinação da predominância metabólica para o fornecimento de energia durante um exercício apresenta extrema importância para a correta prescrição da atividade. Nesse sentido, muitos são os protocolos de avaliação propostos para detectar a intensidade de transição entre os metabolismos aeróbico e anaeróbico (TEGTBUR; BUSSE; BRAUMANN; 1993; WASSERMAN; MCILROY, 1964).

O aumento da produção de lactato é reconhecido como um marcador de stress e toxicidade que indica um aumento da atividade glicolítica (MUELLER *et al.*, 2012). O treinamento produz mudanças metabólicas favorecendo a oxidação do lactato, o que implica que o exercício produz aumento da capacidade aeróbica (DAVIE *et al.*, 1986). A avaliação do lactato plasmático é uma das ferramentas utilizadas para avaliar a transição do trabalho aeróbico (BIANCHI *et al.*, 1997). Portanto as mensurações sanguíneas desse metabólito no que remete a prática do exercício fornecem informações precisas acerca do fornecimento energético para execução do exercício, implicando a utilização desse parâmetro como acompanhamento do treinamento (PYNE; LEE; SWANWICK, 2001).

Entretanto, dependendo da frequência, duração e intensidade, o exercício tanto pode aumentar a produção de EROs e ocasionar danos oxidativos, como também, em intensidades leves e moderadas, pode melhorar a capacidade de defesa antioxidante do organismo (DA CUNHA *et al.*, 2007; TUON *et al.*, 2010). Assim, o exercício físico de intensidade leve a moderada surge como estratégia

neuroprotetora (TUON *et al.*, 2012). Evidências científicas sustentam os benefícios do metabolismo oxidativo em áreas cerebrais de roedores submetidos ao exercício de intensidade leve a moderada (AGUIAR *et al.*, 2007; CARVEY; PUNATI; NEWMAN, 2006; RADÁK *et al.*, 1995; SOMANI *et al.*, 1996).

Deste modo, os roedores são utilizados nos principais modelos animais para estudo do exercício físico nas funções cerebrais e seus mecanismos, assim os principais modelos de atividade física são: respostas a atividades voluntárias como atividades em rodas de correr (BROWN; VAN, 1973; PANG *et al.*, 2006) e ambientes enriquecidos (KEMPERMANN; KUHN; GAGE, 1997; LEWIS, 2004), exercícios forçados como natação (DING *et al.*, 2006; OSTMAN, 1976) e esteira (BROWN *et al.*, 1979; PLOUGHMAN *et al.*, 2005).

Em exercícios forçados, os animais o executam de acordo com as determinações do pesquisador, que estabelece a velocidade, inclinação e tempo de treinamento que obriga os animais a realizarem o exercício físico em intensidades e solicitações energéticas maiores (ARIDA *et al.*, 2011). Assim, a corrida em esteira ativa as respostas neuroendócrinas de estresse e obriga o animal a correr em uma velocidade constante, de acordo com o protocolo de treinamento físico (DOHM; HAYES; GARLAND, 2001; LIGHFOOT *et al.*, 2001). O exercício esteira é um método comum de treinamento utilizado pelos pesquisadores que investigam adaptações fisiológicas causadas pelo exercício. Este tipo de treinamento é muito utilizado devido sua simplicidade e eficácia. Além disso, vários animais podem treinar ao mesmo tempo e ainda proporciona as maiores respostas do metabolismo aeróbio que, devido à intensidade controlada, induz alguns dos mais consistentes efeitos do treinamento físico (KEMI *et al.*, 2002). Este tipo de exercício tem se mostrado também capaz de promover mudanças no sistema nervoso. O exercício em esteira, a curto e longo prazo, pode induzir mudanças no córtex sensório-motor, corpo estriado e cerebelo (KIM *et al.*, 2010).

Um importante efeito benéfico do exercício, no cérebro, é o aumento da expressão de neurotrofinas, como o fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF), que atua como modulador de neurogênese, plasticidade neuronal e neuroproteção (BOBINSKI *et al.*, 2011; FOSTER; ROSENBLATT; KULJIS, 2011; GOMEZ-PINILLA *et al.*, 2002; HAYES *et al.*, 2008; TAJIRI *et al.*, 2010). Estudos relatam que o exercício esteira promove a proliferação de células no giro dentado do hipocampo (HC) em ratos. Deste modo, o exercício físico melhora o desempenho

motor, a função cognitiva e reduz a mortalidade e incidência da DP (CHEN, 2003; TILLERSON *et al.*, 2003 *apud* CHO *et al.*, 2013; GÓES *et al.*, 2014).

Em um modelo experimental de DP, o exercício físico foi capaz de provocar menores déficits após a lesão, além de elevar uma maior sobrevivência de neurônios dopaminérgicos na região nigroestriatal, aumentando os níveis de fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e BDNF (TAJIRI *et al.*, 2010) e DA no corpo estriado (TILLERSON *et al.*, 2003; PETZINGER *et al.*, 2007), quando comparado aos animais lesionados sedentários, evidenciando que o exercício físico melhora os sintomas motores e déficits neuroquímicos em modelos animais de DP (TILLERSON *et al.*, 2003). Desta forma, sugere-se que o exercício esteira pode fornecer um valor terapêutico para o tratamento da DP. Entretanto, novos estudos são necessários para um melhor entendimento e aprofundamento sobre os efeitos do exercício físico no cérebro.

Analisando esses efeitos, pondera-se a hipótese de que a prática regular de exercícios físicos poderá proporcionar benefícios aos indivíduos acometidos pela DP, se não responsável pela cura, mas tendo função importante para amenizar ou retardar o aparecimento dos sintomas e garantir determinada independência para os parkinsonianos (RUBERT; REIS; ESTEVES, 2007). Mesmo considerando os resultados favoráveis, clínicos e pré-clínicos, pela utilização do exercício físico na DP, fazem-se necessários estudos que determinem, por exemplo, o tipo de exercício físico, se aeróbio ou anaeróbio, o período para início da prática, resposta neuroquímica e eficácia da associação com outras estratégias terapêuticas (BARROSO, 2012).

## **1.8 Relevância e Justificativa**

O mundo está envelhecendo, estima-se que, em 2050, exista cerca de dois bilhões de pessoas com mais de sessenta anos no mundo, a maioria vivendo em países emergentes (BRASIL, 2006). Portanto, o aumento da expectativa de vida ocasiona consequências como aumento da preocupação da manutenção da saúde do idoso, principalmente quando existe a presença de uma doença crônica e degenerativa como a DP (PETERNELLA; MARCON, 2009). As intervenções terapêuticas de rotina, especialmente as ações farmacológicas, têm contribuído significativamente, contudo apresentam limitações.

Durante muitos anos, o exercício físico não era recomendado para indivíduos com diagnóstico de DP, por se acreditar que o mesmo não melhorava ou ainda prejudicava a fisiopatologia da doença, devendo, assim, ser evitado (HIRSCH; FARLEY, 2009). Contudo, evidências advindas de estudos translacionais sugerem, cada vez em maior número, que o exercício ou a fisioterapia exercem, sim, um efeito benéfico nas características cardinais da DP. Acredita-se que o exercício físico regular exerça um efeito positivo sobre a resposta neuroquímica (AGUIAR *et al.*, 2007; CARVEY; PUNATI; NEWMAN, 2006; TUON *et al.*, 2012).

Desta forma, o exercício físico aeróbico tem se mostrado candidato potencial à terapia coadjuvante da DP por ser capaz de atuar em diversos mecanismos patogênicos da doença, como no combate do estresse oxidativo e diminuição da excitotoxicidade. O exercício físico constitui prática não invasiva para alcançar a neuroproteção com o objetivo de se aprimorar a resposta ao tratamento medicamentoso (ARCHER; FREDRIKSSON, 2010; FREDRIKSSON *et al.*, 2011). Porém, o mecanismo que explica os efeitos do exercício físico nos neurônios dopaminérgicos não está completamente esclarecido (AL-JARRAH *et al.*, 2010). Estudos são necessários para se determinar os mecanismos neuroprotetores da prática do exercício físico que sejam realmente eficazes na diminuição da progressão da DP e na melhora da qualidade de vida dos pacientes, o que justifica a relevância deste estudo. Assim, o exercício físico pode conferir neuroproteção, tornando mais lento o desenvolvimento e progressão da doença através de mecanismos adaptativos de vias de sinalização comprometidas.

Dessa maneira, torna-se importante avaliar os efeitos benéficos do exercício físico na progressão da DP, oferecendo uma estratégia a ser utilizada em associação ou não com o tratamento farmacológico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do exercício físico na lesão estriatal unilateral por 6-OHDA, em ratos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do exercício físico nas alterações de comportamento rotacional induzidos pela apomorfina;
- Avaliar os efeitos do exercício físico as alterações comportamentais nos testes do campo aberto, *rotarod*, Y-maze e reconhecimento de objeto;
- Avaliar o efeito do exercício físico na concentração de lactato;
- Determinar os efeitos do exercício físico as concentrações estriatais de DA e de seus metabólitos (DOPAC e HVA) por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC);
- Estudar o efeito neuroprotetor do exercício físico na peroxidação lipídica, liberação de nitrito e glutatona reduzida;
- Avaliar a influência do exercício físico sobre a atividade da acetilcolinesterase;
- Avaliar o efeito do exercício físico por meio da determinação das concentrações de BDNF no cérebro;
- Analisar os efeitos do exercício físico no número de células imunopositivas para a enzima tirosina hidroxilase (TH) por meio de ensaios imunohistoquímicos;
- Analisar o número de células imunopositivas para o transportador de dopamina (DAT), por meio de ensaios imunohistoquímicos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*), com peso variando entre 200-250g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais permaneceram em caixas de prolipropileno com, no mínimo 6, à temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água a vontade.

Para os cuidados com animais, esta pesquisa seguiu os princípios éticos da experimentação animal instituído pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA), com protocolo sob nº 90/2014 (Anexo 1).

#### 3.2 Drogas e Reagentes

As drogas utilizadas: 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma Aldrich, USA), apomorfina (Sigma Aldrich, USA), cloridrato de ketamina (Vetanarcol®, Laboratório König S/A), cloridrato de xilazina (Kensol®, Laboratório König S/A). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### 3.3 Cirurgia Estereotáxica: Injeção Estereotáxica Unilateral com 6-OHDA

Os procedimentos para lesão do CE foram realizados através de cirurgia estereotáxica. Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de xilazina (10mg/kg, i.p.) e ketamina (100 mg/kg, i.p.), sendo submetidos à tricotomia da região superior da cabeça, em seguida fixados ao aparelho estereotáxico (Figura8). Foi realizada uma incisão de, aproximadamente, 2 cm de comprimento com um bisturina parte superior do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, a fim de encontrar o bregma (junção entre as suturas sagital e coronal). Os sítios onde as lesões foram realizadas se situavam nas coordenadas descritas no quadro 1, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986). Foram realizadas duas perfurações e administradas em cada uma (1µl de uma solução de 6-OHDA

dissolvida em salina 0,9% contendo 0,2% de ácido ascórbico, na concentração 12  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) no corpo estriado direito (CED), usando uma seringa de Hamilton de 5 $\mu\text{l}$ . A seringa foi deixada no local de aplicação por 5 min, a fim de assegurar que o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente (KIM *et al.*, 1998). Durante o procedimento cirúrgico, a 6-OHDA preparada foi resfriada a 4°C e protegida da luz. Os animais do grupo falso operado (FO) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, no entanto, não receberam a neurotoxina (6-OHDA), sendo introduzida à agulha nas mesmas coordenadas estereotáticas, seguida de infusão de salina estéril e veículo (ácido ascórbico a 2%).

Figura 8 – Aparelho estereotático.



Fonte: Arquivo pessoal.

Logo após a cirurgia, a incisão foi suturada com fio náilon 3.0 e o animal foi colocado na caixa de polipropileno sob luz vermelha para manutenção da temperatura corpórea e recuperação.

Quadro 1 – Sítios das lesões estriatais unilaterais com 6-OHDA.

<b>Coordenadas Estriatais</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>2<sup>a</sup></b>
Antero-posterior	+ 0,5	- 0,9
Médio-lateral	- 2,5	- 3,7
Dorso-ventral	+ 5,0	+ 6,5

Fonte: PAXINOS; WATSON, 1986.

### 3.4 Procedimento Experimental

#### 3.4.1 Protocolo de exercício físico esteira

Os animais foram distribuídos em 4 grupos de, pelo menos, 6 animais, de acordo com a apresentação do quadro 2. O exercício físico em esteira era realizado por 30 minutos, com uma velocidade de 20 cm/segundo, uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos (Figura 9). Este procedimento iniciava 24 horas após a cirurgia esterotáxica e injeção de 6-OHDA (CHEN, 2003; CHEN *et al.*, 2005; TILLERSON *et al.*, 2003 *apud* CHO *et al.*, 2013). Após esse período, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e, em seguida, eutanasiados, retiradas das áreas cerebrais e realização dos estudos neuroquímicos e imunohistoquímicos.

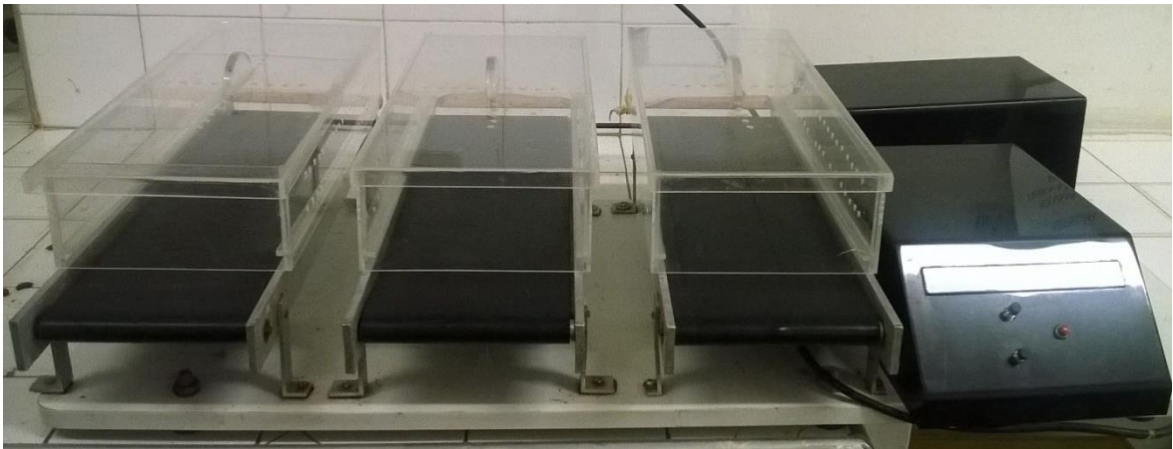
Quadro 2 – Divisão dos Grupos e Protocolo de Exercício Físico.

GRUPOS	Protocolo de Exercício
1 - Falso operado (FO), sem exercício	FO, cirurgia estereotáxica, com injeção intraestriatal de salina.
2 - Falso operado (FO), com exercício	FO, cirurgia estereotáxica, com injeção intraestriatal de salina + realização de exercício físico esteira 30 minutos durante 14 dias.
3 - (6-OHDA), sem exercício	6-OHDA, grupo lesionado com 6-OHDA, injetada no CED (12 µg/2 µL, intraestriatal) sem exercício físico em esteira.
4 - 6-OHDA, com exercício	6-OHDA, grupo lesionado com 6-OHDA, injetada no CED (12 µg/2 µL, intraestriatal) + realização de exercício físico esteira 30 minutos durante 14 dias.

Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 9 – Esteira automatizada constituída de 3 raias.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.5 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram propostos para avaliar os efeitos da aplicação do protocolo de exercício físico em esteira. No 14<sup>o</sup> dia da aplicação do protocolo, os animais foram divididos em dois grupos para realização dos testes comportamentais. Os mesmos foram submetidos a testes para avaliar o comportamento rotacional, atividade locomotora e memória. Os testes realizados foram: Atividade rotacional com apomorfina; Atividade locomotora com campo aberto, *rotarod*; Memória com *Y-maze* e reconhecimento de objeto. O teste de apomorfina foi o primeiro a ser realizado, após 24 horas deste, dava-se continuidade aos demais testes comportamentais.

## Esquema 1 – Grupo 1: Desenho Experimental.



No grupo 1, aplicação de testes locomotores e atividade rotacional: 1º dia, os animais sofreram a lesão estriatal pela 6-OHDA (falso operado). Vinte e quatro horas após a mesma iniciava-se protocolo de exercício físico em esteira durante 14º dias consecutivos. No 14º dia de aplicação do protocolo de exercício os animais eram submetidos aos pré-testes do *rotarod* em seguida ao teste de apomorfina. Após um período 24h da aplicação da apomorfina os animais realizavam os testes comportamentais: *Rotarod*, campo aberto, e eutanasiados para realização dos testes neuroquímicos e imunohistoquímicos. Fonte: Elaborado pelo autor.

## Esquema 2 – Grupo 2: Desenho Experimental.

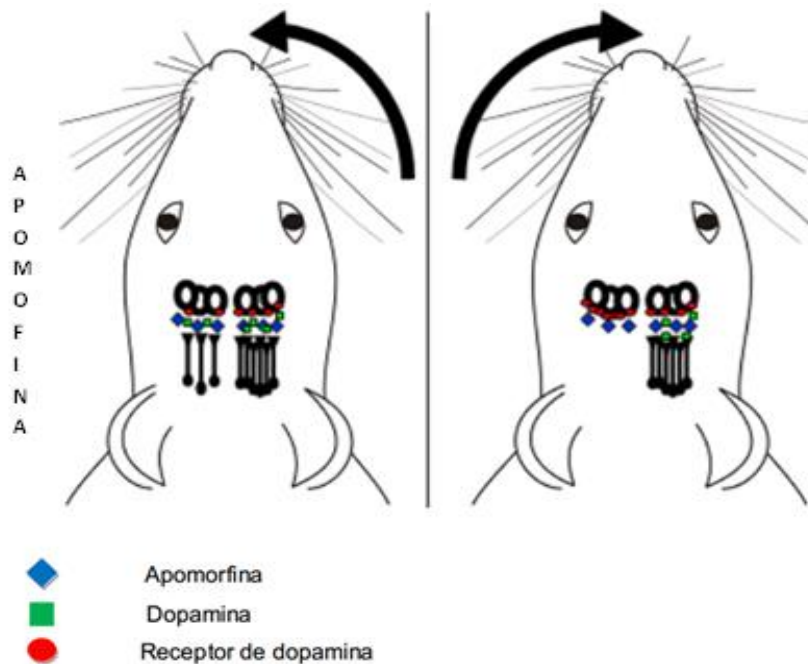


No grupo 2, aplicação dos teste de memória e atividade rotacional: 1º dia, os animais sofreram a lesão estriatal pela 6-OHDA (falso operado). Vinte e quatro horas após a mesma iniciava-se protocolo de exercício físico em esteira durante 14º dias consecutivos. No 14º dia de aplicação do protocolo de exercício os animais eram submetidos aos pré-testes do reconhecimento de objeto, em seguida ao teste de apomorfina. Após um período 24 h da aplicação da apomorfina os animais realizavam os testes comportamentais: Reconhecimento de objeto, *Y-maze* e eutanasiados para realização dos testes neuroquímicos e imunohistoquímicos. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.5.1 Teste rotacional com apomorfina

Os primeiros experimentos de comportamento rotacional foram feitos por Ungerstedt (1968) e Ungerstedt e Arbuthnott (1970). A apomorfina é um agonista direto dos receptores dopaminérgicos, sua administração em animais com lesão unilateral com 6-OHDA induz rotações contralaterais à lesão (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970). Sua ação ocorre nos receptores dopaminérgicos D2 supersensibilizados no lado lesado (Figura 10) (SCHWARTING; HUSTON, 1996).

Figura 10 – Representação da perda parcial de receptores de neurônios dopaminérgicos nigroestratais.



O animal gira para o lado que estiver com menos receptores devido a uma assimetria nos hemisférios cerebrais, decorrente de uma *up regulation* dos receptores dopaminérgicos no lado lesionado. Fonte: adaptado de WIETZIKOSKI, 2006.

Os animais foram submetidos ao teste rotacional duas semanas após a lesão estriatal com 6-OHDA. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (3mg/kg, i.p.) na direção contrária à lesão (lado contralateral), observando-se o número de rotações completas em volta do próprio eixo durante uma hora (KIM *et al.*, 1998).

### 3.5.2 Teste rotarod

O *rotarod* avalia a coordenação motora e equilíbrio de roedores (JIANG *et al.*, 2004; PETZINGER; WALSH *et al.*, 2007). Consiste em uma barra giratória (Figura 11) que permite verificar o potencial de coordenação motora (ROSLAND; HUNSKAAR; HOLE, 1990). No teste *rotarod* foi registrado o número de quedas da barra giratória (12 rpm/min) em 60s (DALLMEIER; CARLINI, 1981; DUNHAM; MIYA, 1957). Para realização deste teste, foi necessário uma adaptação (pré-teste) ao aparelho seguindo o mesmo tempo e parâmetros.

Figura 11 – Aparelho *rotarod* utilizado para realização da análise comportamental.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.5.3 Teste de Campo Aberto (OPEN FIELD) – Atividade Locomotora Espontânea

Este teste é baseado na metodologia descrita por Siegel (1946) e validado por Archer (1973). O campo aberto utilizado foi confeccionado em acrílico, consiste numa arena medindo 50 x 50 cm com fundo preto dividido em quatro quadrantes iguais, iluminada com luz vermelha (Figura 12). O teste foi realizado em seis minutos, em que o primeiro minuto consistia em um período de adaptação.

Figura 12 – Arenado teste de campo aberto dividido em quatro quadrantes iguais.



Fonte: Arquivo Pessoal.

Os parâmetros observados durante a realização do experimento:

- a) Número de cruzamentos (NC): cruzamento com as quatro patas de um quadrante para o outro (movimentação espontânea e exploratória);
- b) Número de *Grooming* (NG): comportamentos de autolimpeza;
- c) Número de *Rearing* (NR): levantamento de patas dianteiras para exploração vertical.

A arena era mantida limpa com álcool a 10%, após cada animal ter sido retirado para evitar que o cheiro da urina e fezes interferissem no teste.

#### **3.5.4 Teste Labirinto em Y (Y- Maze) (STONE et al., 1991)**

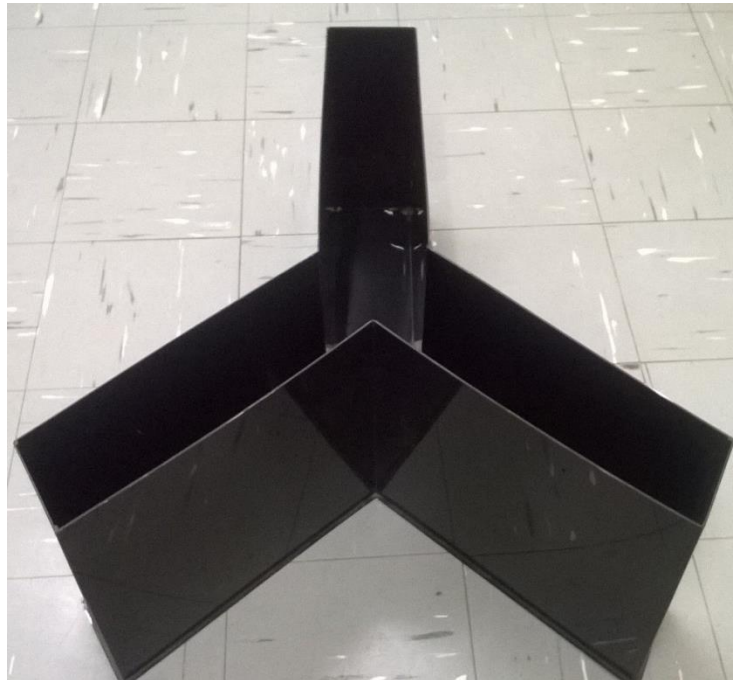
Este teste avalia a memória operacional (*working memory*) e o aprendizado. O labirinto em forma de Y consiste em uma caixa de acrílico preta (35 cm de altura, 40 cm de comprimento e 12 cm de largura) com três braços iguais (Figura 13). Neste teste, o animal foi colocado no ambiente por oito minutos durante o qual foi observada a alternância de braços de forma espontânea. A sequência dos braços em que os animais entraram foi então anotada e as informações analisadas

de forma a determinar o número de entradas no braço sem repetição. Uma alternância foi considerada correta se o animal visitou um novo braço e não retornou ao anteriormente visitado.

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem lembrar em qual braço eles entraram por último. Assim, a percentagem das alternâncias foi calculada como a razão entre os números de acertos e o número total de entradas realizadas durante o período de observação (DALL'IGNA *ET al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 1996), de acordo com formula matemática abaixo:

$$\text{Alternações Espontâneas (\%)} = \frac{\text{Números de acertos} \times 100}{\text{Número total de entradas} - 2}$$

Figura 13 – Y-maze utilizado para realização do teste.



Fonte: Arquivo pessoal.

### **3.5.5 Teste Reconhecimento de objeto**

A memória de reconhecimento de objetos é a capacidade de discriminar os objetos que tenham sido previamente encontrados e objetos que não tenham. Os roedores possuem uma tendência natural para gastar mais tempo explorando objetos novos do que aqueles conhecidos.

No primeiro dia, antes de qualquer procedimento, o animal foi colocado na caixa, e deixado por 5 minutos, sem nenhum objeto, para adaptação ao ambiente. Após 24 horas dois objetos semelhantes foram colocados equidistantes, um ao lado do outro, e os animais foram submetidos ao pré-teste durante cinco minutos (Figura 14a). No mesmo dia, após um período de retenção de 1,5 hora, foi testada a memória de curta duração, onde o animal foi recolocado na caixa e submetido a um teste de cinco minutos com um objeto familiar ao do pré-teste e um objeto novo (diferente) (Figura 14b).

No teste, foram registrados os seguintes parâmetros: tempo gasto para explorar cada objeto (novo e familiar), sendo considerada exploração quando o animal fica com o focinho até 0,5 cm do objeto. A principal medida foi a razão de discriminação dos objetos, sendo estabelecida pelo tempo gasto em explorar o objeto novo dividido pela soma dos tempos gastos para explorar o objeto novo e o objeto familiar ( $t_{novo}/t_{novo} + t_{familiar}$ ) (ENNACEUR; DELACOUR, 1988).

Para o teste de reconhecimento de objeto, foi utilizada uma arena retangular medindo 50 x 50 cm, iluminada com luz vermelha, sendo o piso dividido em quatro quadrantes iguais com objetos de plástico (Figura 14 a b).



Figura 14 – Arenado teste reconhecimento de objeto, dividido em quatro quadrantes iguais.

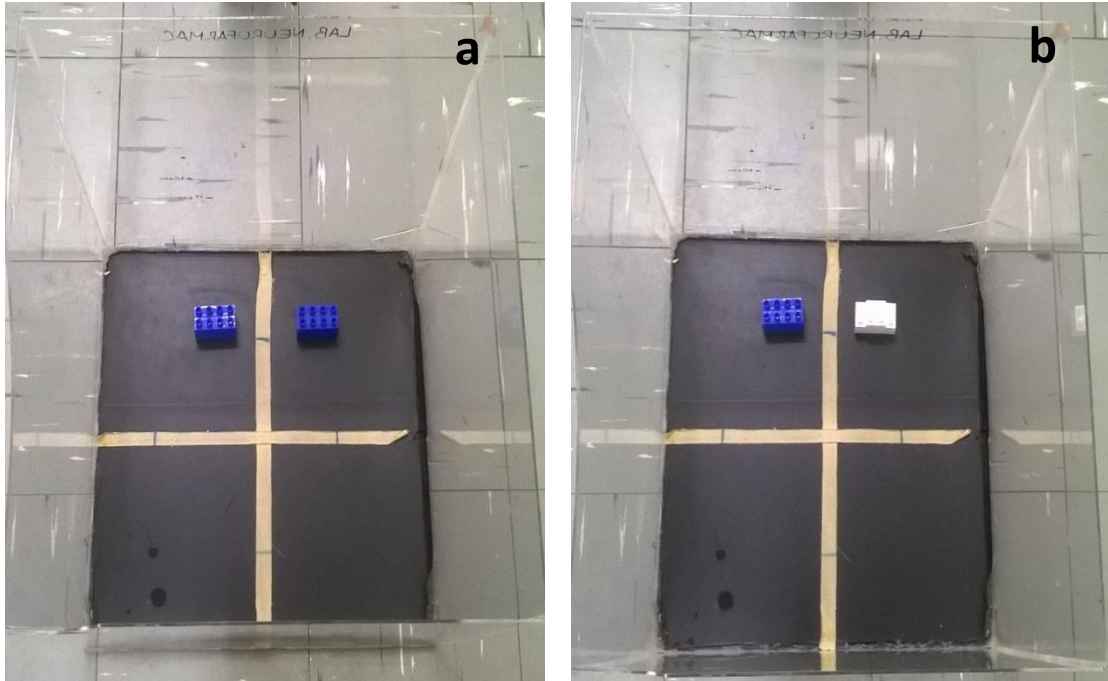


Figura (a) dois objetos semelhantes foram colocados equidistantes, (b) objetos diferentes, cor e formato diferenciados (objeto novo). Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.6 Determinação de lactato enzimático

Para avaliar o efeito do protocolo de exercício físico em esteira de intensidade moderada sobre a determinação de lactato em modelo de 6-OHDA em ratos, foi coletado dos animais sangue no último dia (14<sup>o</sup> dia), após a sessão de treino para avaliarmos a concentração de lactato sanguíneo.

O lactato sanguíneo foi dosado - kit lactato enzimático (Labtest Diagnóstico S.A.) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de sangue foram coletadas, através do plexo retro-orbital, separadas em alíquotas (microtubos), centrifugadas (4000 rpm/10min) imediatamente após a coleta, sendo o plasma separado. O referido material foi coletado em todos os grupos da pesquisa. Os resultados foram expressos em mg/dL.

### **3.7 Dissecção das áreas cerebrais**

#### **3.7.1 Áreas cerebrais para testes neuroquímicos e imunohistoquímicos**

Logo após os testes de comportamento, os animais foram divididos para os testes neuroquímicos e imunohistoquímicos. Para os imunohistoquímicos, os animais escolhidos foram decapitados com uma guilhotina (*Harvard, USA*) sem utilização de anestésicos, pois os mesmos poderiam interferir nos resultados da pesquisa, por se tratar de estudo que envolve o SNC. Os cérebros foram removidos por inteiro, depois divididos em dois por um corte coronal com uma lâmina. A porção caudal dos cérebros, contendo o CE foi preparada para os testes. Essas amostras foram acondicionadas em formol tamponado 4% para fixação do material e, após 24h, esta solução foi substituída por álcool 70%.

Para os testes neuroquímicos, buscou-se avaliar os efeitos do exercício sobre a lesão unilateral por 6-OHDA, avaliando diferentes áreas cerebrais (CPF, HP e CE) com intuito de analisar a destruição progressiva produzida pela 6-OHDA no corpo estriado (área lesionada) e se a mesma pode afetar outras áreas cerebrais e não somente aos neurônios da via nigroestriatal.

Os animais foram decapitados como descrito anteriormente, sendo os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em placa de Petri com gelo. Em seguida, CPF, CE e HC foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecção. Terminada a dissecção, as áreas foram acondicionadas em tubos de microcentrífuga, pesadas e armazenadas a -70°C até o dia da análise.

### **3.8 Determinação da concentração de monoaminas (DA) e seus metabólitos (DOPAC e HVA) com HPLC**

O CE foi utilizado para preparar homogenatos a 10%. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) por 30 segundos e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µl do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC para a análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 µm da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS) como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahidrofurano 1,7% v/v. DA, DOPAC e HVA foram eletronicamente indentificados através de um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V, relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl.

- Padrões:

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng de DA, DOPAC, HVA (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculas no programa *Microsoft Excel®* em um computador e os resultados expressos em ng/g de tecido.

### **3.9 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS) (DRAPER; HADELY, 1990)**

Um dos principais componentes celulares afetados pelo estresse oxidativo é a membrana celular que sofre um processo de peroxidação. O MDA é um aldeído de cadeia curta, sendo o principal produto da peroxidação lipídica. Para indentificar o efeito do protocolo de exercício físico em esteira de intensidade moderada sobre a determinação da peroxidação lipídica em modelo de 6-OHDA em ratos, foi avaliado pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) nos homogenatos. As amostras foram homogenizadas a 10% com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63 µL do homogenato foi misturado a 100 µL de HClO<sub>4</sub> 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente (95-100°C) por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada em espectrofotômetro por absorbância 535 nm e expressa como micrograma de malonildialdeído (MDA)/g de tecido (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

### 3.10 Determinação de Nitrito (GREEN *et al.*, 1982)

A molécula de óxido nítrico (NO) é extremamente tóxica e danifica proteínas, lipídeos de membrana e DNA. A partir da dosagem de dióxido de nitrogênio/Nitrato (NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>) de forma indireta podemos quantificar a produção do NO, visto que estes dois são seus metabólitos. Para avaliar os efeitos do protocolo de exercício esteira na produção de NO, foram determinados níveis de nitrito em homogenatos dos cérebros de ratos imediatamente após a decapitação em todos os grupos.

- Preparação da Curva Padrão:

Foram pesados 7mg de Nitrito de Sódio (NaNO<sub>2</sub>) e dissolvidos em 10 mL de água destilada (estoque-10mM). Foram feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1 mM, 100 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM, 0,312 µM. Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1982).

Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (w/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Após a centrifugação (800rpm, 10 min), os sobrenadantes foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante foi incubada com 100 µl do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%/N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1%/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1%/diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 min. A absorbância é medida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito (µM) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub>.

### 3.11 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968)

A glutathiona, um tripeptídeo (g-L-glutamil-cisteinil-glicina), permanece no organismo em formas GSH e GSSG, agindo diretamente em processos biológicos importantes, incluindo metabolismo e proteção celular. Em particular, problemas na síntese de glutathiona estão agregados a determinadas doenças, nas quais os níveis de glutathiona e enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser expressivos na

avaliação do estresse oxidativo. Alterações na concentração deste tripeptídeo podem ser consideradas um indicador favorável em determinadas desordens fisiológicas, como alterações dos estados antioxidantes (MENEZES, 2012).

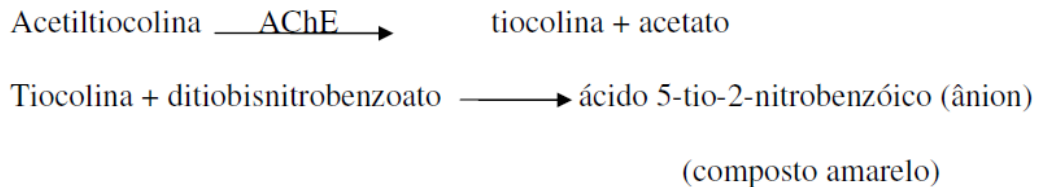
Os níveis de GSH foram avaliados para estimar defesas endógenas contra o estresse oxidativo. A determinação da concentração do GSH foi realizada na placa de ELISA (método SEDLAK e LINDSAY, 1968, modificado). Baseia-se na reação do reagente de Elleman, o 5,5'-ditiobios (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido-2-nitro-5-tiobenzóico. O preparo das amostras foi feito da seguinte forma: 40 µL de cada amostra (homogenato do tecido a 10% em tampão fosfato) foi adicionada a um tubo de microcentrífuga + 50 µL de água destilada e 10 µL de ácido tricloro acético (ATC) 50%. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos, à temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram separados. Adicionaram-se 60 µL dos sobrenadantes à placa de ELISA (mantidas resfriadas), assim como os brancos. O material permaneceu resfriado durante todo o ensaio. Imediatamente antes da leitura, foi adicionado o tampão fosfato pH 7,4 + 0,65ml de DTNB 0,01 M metanol. Adicionaram-se 102 µL desta solução em cada poço da placa. Foi realizada leitura da absorbância a 412 nm. A concentração da glutatona reduzida foi expressa em µg de GSH por grama de tecido. A curva padrão foi obtida mediante a leitura de várias concentrações de GSH padrão (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25;100).

### **3.12 Determinação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE)**

A atividade acetilcolinesterásica (AChE) foi determinada a 25 °C e pH 8,0, de acordo com o método de Ellman *et al.*, (1961), que tem como princípio a medida da velocidade de produção da tiocolina à proporção que a acetiltiocolina, utilizada como substrato, é hidrolisada. Isto é acompanhado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5'-ditio-bis-2 nitrobenzoato (I) para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2 nitrobenzóico (II).

A atividade enzimática foi medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante, pelo menos, 10 minutos (ALLES; HAWES, 1953). As leituras das absorbâncias foram feitas no comprimento de onda de 412 nm, através de um espectrofotômetro (*Beckman* DU acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA ou

*Beckman*, modelo DU 640B, CA, USA) que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade (leitura em décimos de milésimos de absorvância). A atividade específica foi expressa em nmoles de acetiltiocolina hidrolisados por miligrama de proteína por minuto.



As soluções utilizadas neste teste:

- Solução de ácido 5:5'-ditiobis-2 nitrobenzoato, DTNB (Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 mM em tampão de sódio;
- Solução de iodeto de acetilcolina, ATC (Sigma, Sr. Louis, MO, USA) 75 mM em água bidestilada; Tampão de Fosfato de Sódio: Na H<sub>2</sub>O PO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, 0,1 mM em água bidestilada, pH 7.0

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato 10% e o homogenato (5 µL) foi adicionado a uma cubeta contendo 500 µL do tampão, 895 µL de água destilada e 50 µL de DTNB 0,01 Mea absorvância zerada.

Após a absorvância ser deixada em zero, a cubeta é retirada e acrescentado 50 µL de ATC. Absorvância foi registrada por 3 min, em 412 nm. A atividade da enzima foi calculada como modificações na absorvância do minuto 3 para o minuto 0, relativo ao conteúdo de proteína contido no homogenato (LOWRY *et al.*,1951).

### 3.13 Dosagem de Proteína (BRADFORD, 1976)

O método é baseado na interação do corante *Coomassie Blue* G250 (BG250) e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente em 595 nm. A Solução Mãe de *Coomassie Blue* G250 foi diluída 5x com H<sub>2</sub>O destilada antes de ser usada e permaneceu na geladeira por, no máximo, uma semana (Ex.: 1mL da solução mãe +

4mL de água destilada) – SOLUÇÃO DE *BRADFORD* Adicionaram-se as soluções (albumina padrão, água destilada, tampão e amostras) aos poços.

Em cada poço foi adicionado 40  $\mu$ L de solução. Por exemplo, se no poço foram adicionados 2  $\mu$ L da amostra, também foram adicionados 38  $\mu$ L do tampão utilizado no preparo da amostra.

Albumina em concentrações crescentes (EM DUPLICATA para fazer a curva padrão) Amostras (tampão utilizado para o homogenato e em seguida foi acrescentado às amostras: o volume final deve ser de 40  $\mu$ L). Branco – 2 poços somente com o homogenato utilizado. Após preencher a placa, foram adicionados 200  $\mu$ l da solução de bradford (diluída) em cada poço. A leitura foi realizada 5 minutos, em comprimento de onda de 595 nm.

### **3.14 Determinação das concentrações de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF)**

O BDNF está expresso em diversas regiões do SNC como medula, SN, amígdala, hipotálamo, cerebelo e hipocampo (ZHOU *et al.*, 2004). Em neurônios dopaminérgicos, o BDNF é responsável pelo desenvolvimento da SN. Para avaliar os efeitos do protocolo de exercício físico em esteira nas concentrações de BDNF, as áreas cerebrais (CPF, HC e CE) foram homogenizadas em 20 volumes de tampão fosfato-salino (PBS) (pH 7,4), adicionados inibidores de protease (Sigma-Aldrich). O nível de BDNF de cada amostra foi quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA; R&D Systems, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos como picograma por grama (pg/g) de tecido.

### **3.15 Análises Imuno-histoquímicas**

#### **3.15.1 Tirosina Hidroxilase (TH)**

TH é uma enzima limitante no processo de síntese de DA, que catalisa a hidroxilação de L-tirosina para L-Dopa, por isso é um importante marcador molecular de neurônios dopaminérgicos. Na doença de Parkinson há uma deficiência de TH, assim como baixos níveis de dopamina. A detecção imunohistoquímica foi realizada

no CE. Para examinar a extensão da desnervação presente na SN, a imunorreatividade a TH foi avaliada sobre o lado lesionada.

Os cortes foram lavados três vezes com 0,05 M Tris *buffer* (TB, pH 7.6). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em metanol a 10% em TB durante 15 min em seguida lavadas TB (três vezes). Foram então pré-incubadas durante 30 minutos com soro de cabra normal a 5% (NGS) em Triton 0,3%, logo após, incubadas com o anticorpo primário (1:500, anti-TH; *Calbiochem, Nottingham, United Kingdom*) em 2% NGS/TB durante a noite a 4°C. Após três banhos com TB, os cortes foram incubados com um anticorpo secundário (*biotinylated goat anti-rabbitIgG* — 1:200, DAKO) por 2 horas, banhados novamente três vezes com TB e revelados com diaminobenzidine 0,05% em 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5–10 min. Após lavagem com água destilada, os cortes foram montados em meio aquoso e cobertos com lamínula para posterior exame.

### **3.15.2 Transportador de dopamina (DAT)**

DAT é o transportador transmembrana de dopamina que fica localizado na terminação nervosa pré-sináptica, onde é responsável por finalizar a atividade de dopamina através da recaptção pré-sináptica desse neurotransmissor, ou seja, o transporte de dopamina para o sítio pré-sináptico (recaptção). Os receptores dopaminérgicos parecem apresentar alterações na DP. A perda de dopamina mesencefálica na doença de Parkinson é acompanhada de uma perda de DAT (RACHAKONDA *et al.*, 2004). O procedimento segue o mesmo para TH, sendo o anticorpo anti-DAT diluído em 1:100.



#### 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

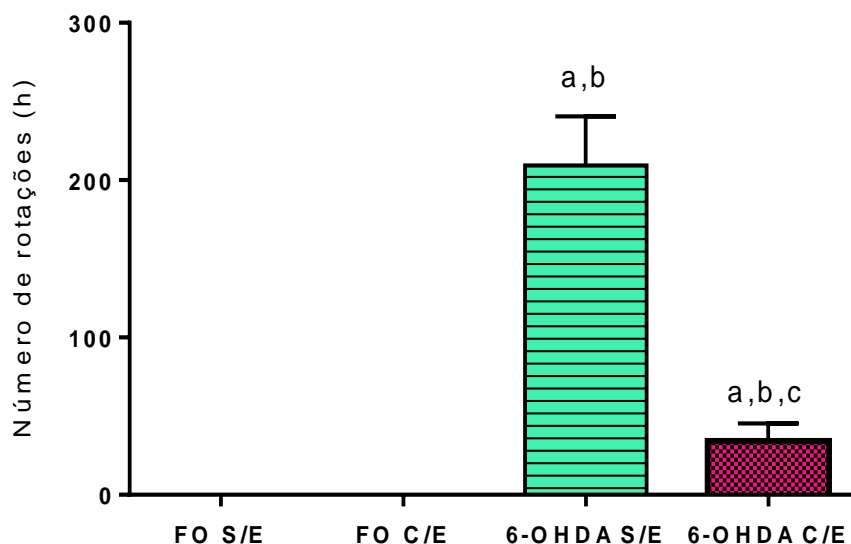
A análise dos dados foi realizada através do *software GraphPad Prism*, versão 6.0 para *Windows*, expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Para comparação de médias entre os grupos, foi utilizado para comparação múltipla dos parâmetros, a Análise de Variância (ANOVA). O nível de significância entre os grupos foi determinado pelo teste de *Student Newman Keuls*. Em todas as análises, foram consideradas, estatisticamente significantes, valores de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito do exercício físico em esteira no comportamento rotacional induzido pela apomorfina em rato com lesão unilateral por 6-OHDA

No 14º dia, após a injeção intraestriatal de 6-OHDA foi administrada apomorfina (3mg/kg, i.p.), um agonista dopaminérgico que induz rotações contrárias à lesão (rotação contralateral). Os resultados mostraram que, quase não foi observado comportamento rotacional no grupo FO sem exercício ( $0,30 \pm 0,17$  rotações/h) e FO com exercício ( $0,0 \pm 0,0$  rotações/h). O grupo 6-OHDA sem exercício apresentou um aumento significativo deste comportamento ( $209,4 \pm 31,12$  rotações/h), o que foi em grande parte revertido no grupo 6-OHDA com exercício ( $34,20 \pm 11,28$  rotações/h). Demonstrou-se, portanto, que o exercício físico foi capaz reduzir significativamente as rotações induzidas por apomorfina resultantes da lesão estriatal com 6-OHDA (Figura 15).

Figura 15 – Efeito do exercício físico sobre o comportamento rotacional (contralateral) induzido por apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

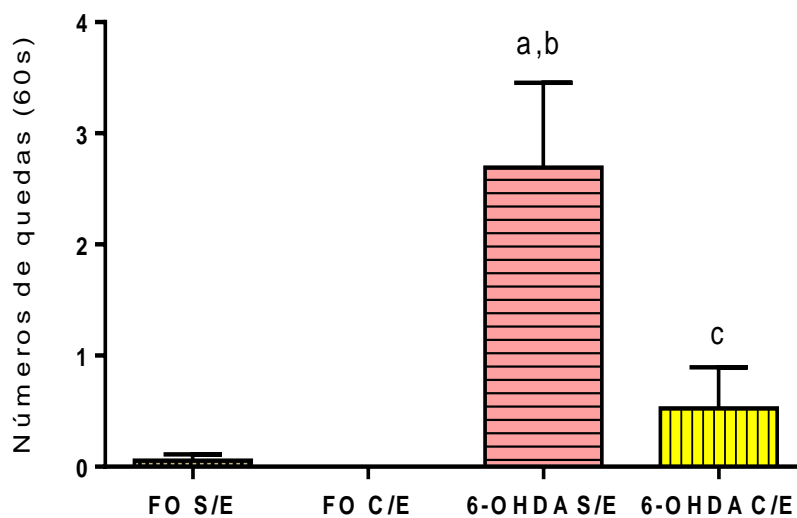


Cada coluna representa média  $\pm$  EPM ( $n = 10-15$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA, *Student Newman Keuls*).

## 5.2 Efeito do exercício físico em esteira sobre atividade locomotora no teste *rotarod* em ratos lesionados com 6-OHDA

No teste *rotarod*, foi avaliada a atividade de coordenação motora, observando o número de quedas durante 60 segundos. O grupo 6-OHDA sem exercício apresentou aumento no número de quedas ( $2,69 \pm 0,76$  quedas/s), quando comparado aos grupos FO (FO S/E  $0,05 \pm 0,05$ ; FO C/E  $0,0 \pm 0,0$ ). Este efeito foi revertido no grupo 6-OHDA com exercício ( $0,55 \pm 0,37$  quedas/s) (Figura 16). Os resultados evidenciaram que o exercício físico foi capaz de reverter, no teste *rotarod*, os prejuízos provocados por 6-OHDA.

Figura 16 – Efeito do exercício físico sobre atividade locomotora avaliado no teste *rotarod*, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 10-15$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA, *Student Newman Keuls*).

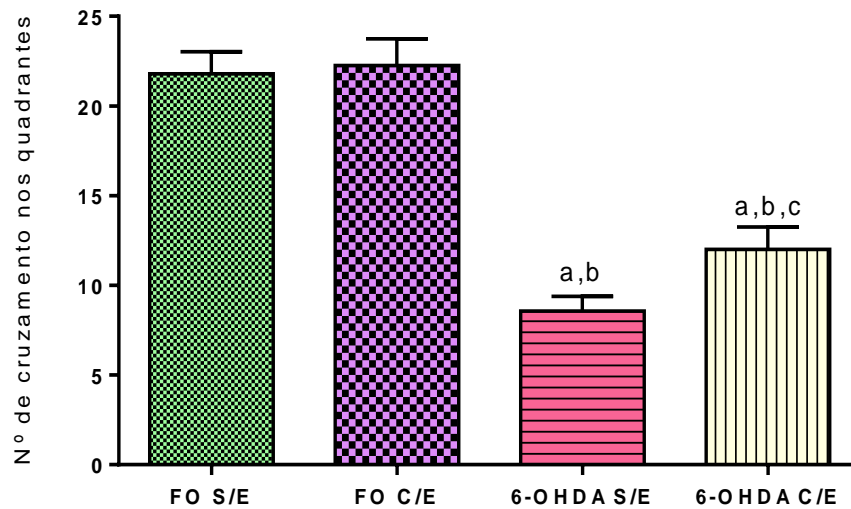
### 5.3 Efeito exercício físico em esteira sobre o teste campo aberto (número de cruzamentos, *grooming* e *rearing*) em ratos lesionados com 6-OHDA

Para avaliar a atividade locomotora, foi realizado o teste campo aberto, observando-se o número de cruzamentos nos quadrantes, durante cinco minutos. O grupo lesionado com 6-OHDA sem exercício físico mostrou uma diminuição no número de cruzamentos ( $8,5 \pm 0,84$ ), quando comparado aos grupos, FO sem exercício ( $21,80 \pm 1,22$ ), FO com exercício ( $22,26 \pm 1,48$ ), sendo possível perceber uma resposta significativa no grupo 6-OHDA com exercício ( $12,00 \pm 1,25$ ) (Figura 17). Apesar dessas alterações na atividade locomotora, não foi observado, qualitativamente, um prejuízo motor nos animais que os tornassem inaptos a realizar os demais testes comportamentais.

Na avaliação da atividade exploratória vertical (*rearing*), o grupo 6-OHDA sem exercício apresentou uma redução na frequência de *rearing* ( $9,84 \pm 0,81$ ), em relação aos grupos FO sem exercício ( $19,19 \pm 1,26$ ) e FO com exercício ( $17,84 \pm 1,35$ ). Este efeito foi revertido no grupo 6-OHDA com exercício ( $16,46 \pm 1,96$ ), obtendo-se resultados próximos aos grupos FO. Esses dados sugerem que o animal, após o treinamento em esteira, apresenta maior atividade em exploração vertical do ambiente (Figura 18).

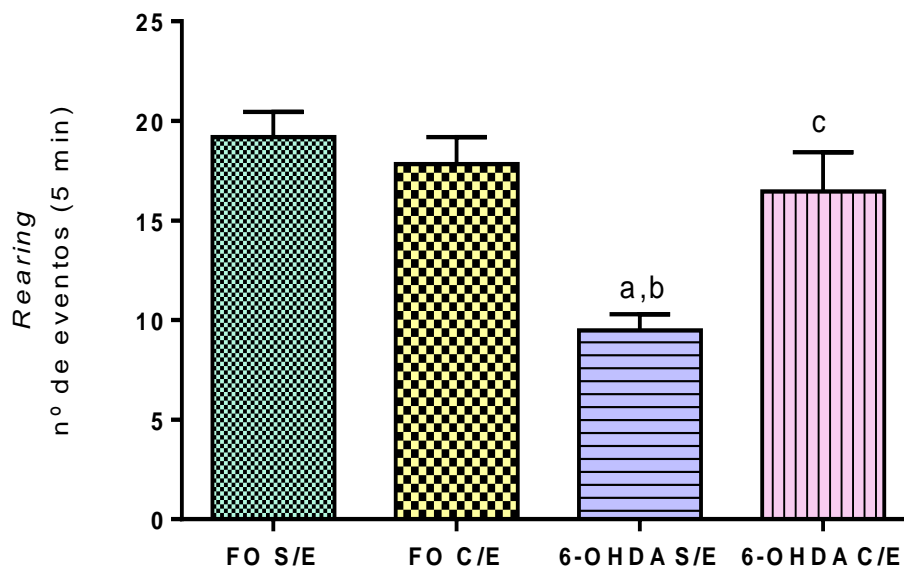
Quanto ao parâmetro de autolimpeza (*Grooming*), o grupo 6-OHDA sem exercício demonstrou um aumento ( $4,52 \pm 0,38$ ) no número de eventos em relação aos grupos FO sem exercício ( $2,36 \pm 0,40$ ) e FO com exercício ( $3,00 \pm 0,48$ ). No grupo 6-OHDA com exercício físico ( $3,21 \pm 0,39$ ), verificou-se uma proteção deste comportamento (Figura 19).

Figura 17 – Efeito do exercício físico no comportamento exploratório horizontal (número de cruzamento), avaliado no teste campo aberto em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



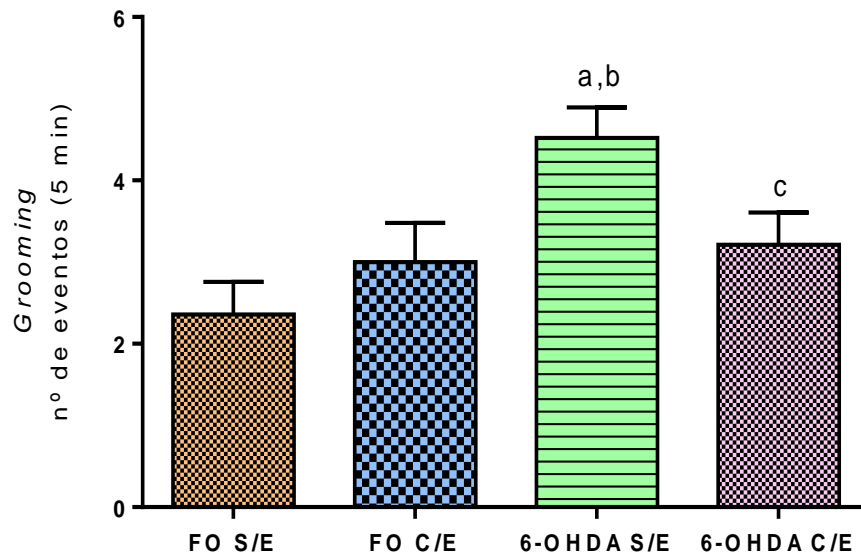
Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 23-25$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 18 – Efeito do exercício físico no comportamento exploratório vertical (*rearing*), avaliado no teste campo aberto, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 23-25$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 19 – Efeito do exercício físico no comportamento *grooming*, avaliada no teste campo aberto, em rato com lesão unilateral por 6-OHDA.

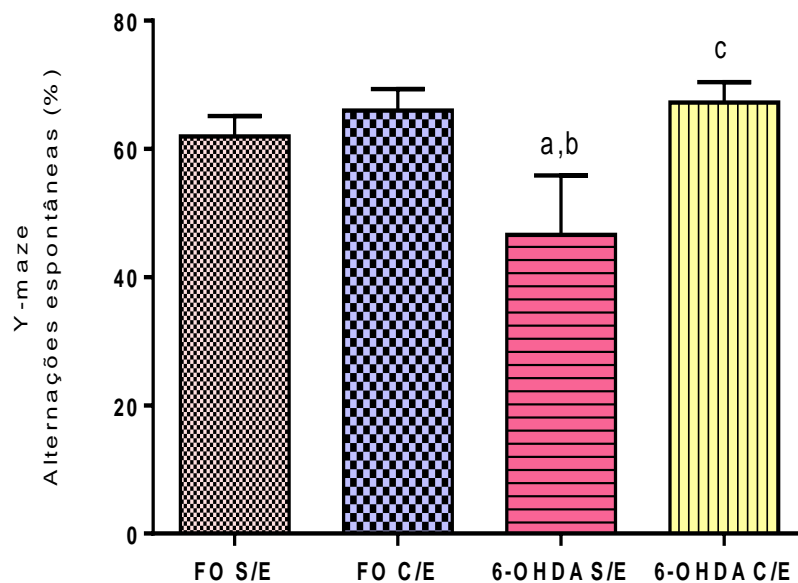


Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n= 23-25 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

#### 5.4 Efeito do exercício físico em esteira sobre a memória operacional, Y-maze em ratos lesionados com 6-OHDA

No teste Y-maze, avaliamos a memória de trabalho ou memória operacional. Os efeitos da lesão estriatal no desempenho dos ratos estão apresentados na Figura 20. O grupo 6-OHDA sem exercício físico apresentou uma diminuição na porcentagem de alterações espontâneas no labirinto em Y ( $46,58 \pm 9,30$ ), quando comparado com os grupos FO sem exercício físico ( $61,92 \pm 3,20$ ) e FO com exercício ( $65,99 \pm 3,35$ ). No grupo 6-OHDA com exercício, foi possível perceber uma resposta positiva ( $67,26 \pm 3,16$ ) em relação ao grupo 6-OHDA sem exercício.

Figura 20 – Efeito do exercício físico sobre a avaliação de memória operacional, no teste Y-maze, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

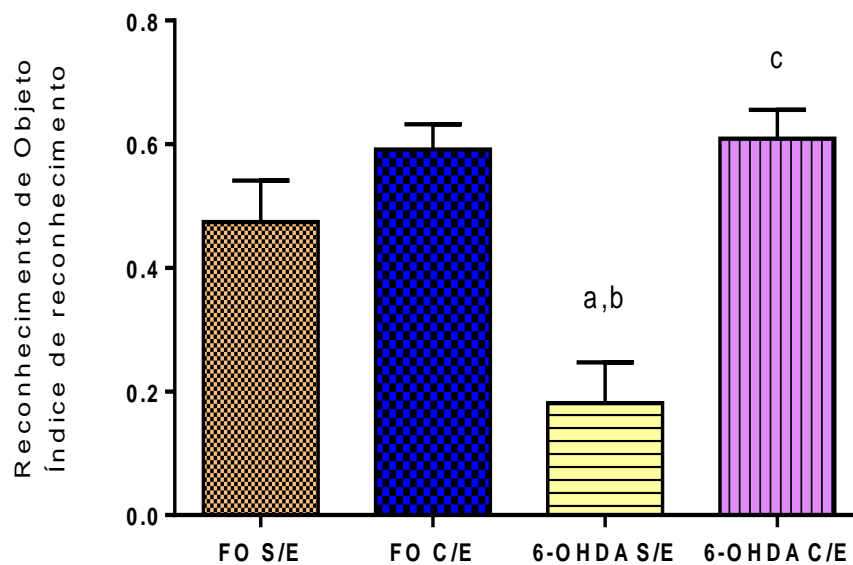


Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 10-13$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

### 5.5 Efeito do exercício físico em esteira no comportamento reconhecimento de objeto em ratos lesionados com 6-OHDA

No teste reconhecimento de objeto, avaliamos a memória de curto prazo. Os efeitos da lesão estriatal no desempenho dos ratos estão apresentados na Figura 21. O grupo 6-OHDA sem exercício físico apresentou uma diminuição da memória de curto prazo ( $0,18 \pm 0,06$ ), em relação aos grupos FO sem exercício físico ( $0,47 \pm 0,06$ ) e FO com exercício físico ( $0,59 \pm 0,04$ ). No grupo 6-OHDA com exercício, evidenciou-se uma melhora na memória de curto prazo ( $0,61 \pm 0,04$ ) para valores iguais a dos grupos FO.

Figura 21 – Efeito do exercício físico no teste de reconhecimento de objeto, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



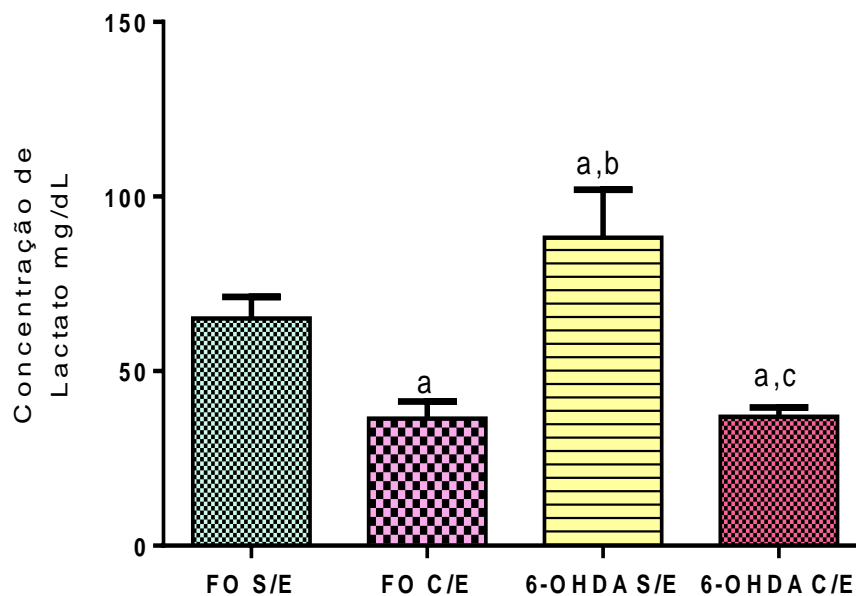
Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 9-11$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).



## 5.6 Efeito do exercício físico em esteira na concentração de lactato em ratos lesionados com 6-OHDA

O teste para determinação da concentração de lactato foi realizado no último dia (14<sup>o</sup> dia), após a aplicação do protocolo de exercício físico. O grupo 6-OHDA sem exercício ( $88,23 \pm 13,76$ ) apresentou uma concentração de lactato maior, quando comparado com o grupo FO sem exercício ( $65,18 \pm 61,00$ ). Os grupos submetidos ao protocolo de exercício apresentaram uma redução significativas concentrações de lactato (FO com exercício  $39,39 \pm 4,89$ ; 6-OHDA com exercício  $36,93 \pm 2,71$ ) (Figura 22).

Figura 22 – Efeito do exercício físico no teste de concentração de lactato após aplicação do protocolo de exercício (14<sup>o</sup> dia), em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 7-9 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

### **5.7 Determinação das concentrações de dopamina (DA) e seus metabólitos (DOPAC e HVA) nos corpos estriados direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão por 6-OHDA, submetidos ao protocolo de exercício físico esteira**

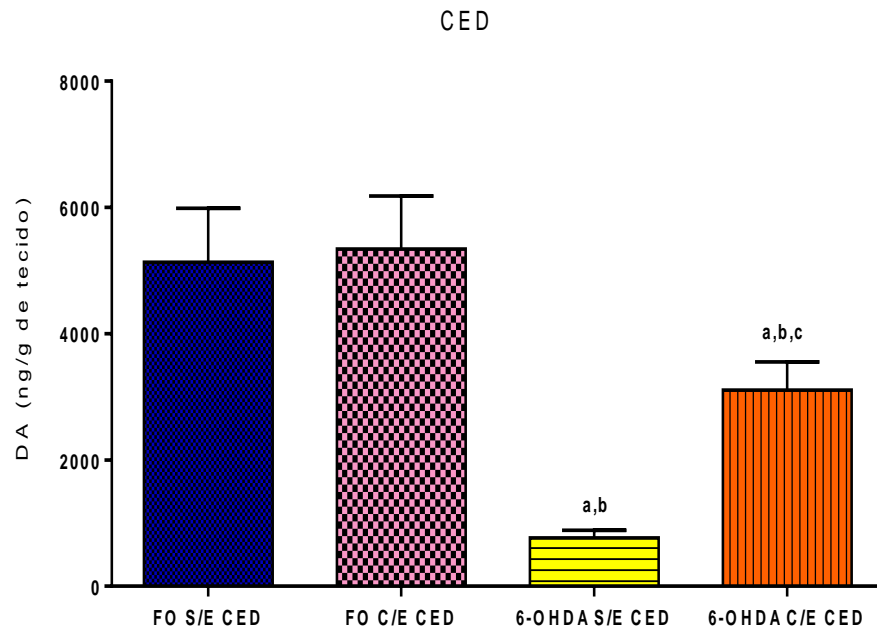
A injeção intraestriatal de 6-OHDA causou dano oxidativo, consequente da destruição tecidual e diminuição das concentrações de monoaminas expressos como ng/g de tecido. O grupo 6-OHDA sem exercício apresentou uma redução nas concentrações de DA (CED:  $746,9 \pm 123,0$ ; CEE:  $2520 \pm 311,5$ ), quando comparado aos grupos FO sem exercício (CED:  $5134 \pm 851,0$ ; CEE:  $5574 \pm 657,6$ ) e FO com exercício (CED:  $5340 \pm 839,4$ ; CEE:  $5004 \pm 566,2$ ). Como esperado, os grupos FO, sem e com exercício, mostraram valores de DA semelhantes nos lados direito e esquerdo. Diferenças significativas foram observadas no grupo lesionado por 6-OHDA e submetidos ao protocolo de exercício físico (CED:  $3109 \pm 443,3$ ; CEE:  $6000 \pm 598,1$ ), quando comparados ao grupo lesionado sem exercício (Figuras 23).

Quanto ao DOPAC, principal metabólito cerebral da DA, no grupo 6-OHDA sem exercício, evidenciou-se uma diminuição em suas concentrações (CED:  $197,5 \pm 29,68$ ; CEE:  $697,8 \pm 98,00$ ), em relação ao grupo FO sem exercício (CED:  $1235 \pm 268,0$ ; CEE:  $1889 \pm 164,0$ ) e FO com exercício (CED:  $1200 \pm 229,6$ ; CEE:  $1674 \pm 197,8$ ), porém não ocorreram diferenças expressivas no grupo 6-OHDA com exercício (CED:  $342,4 \pm 40,23$ ; CEE:  $1378 \pm 94,53$ ) (Figuras 24).

Com relação às contrações de HVA, o grupo 6-OHDA sem exercício apresentou alterações expressivas (CED:  $47,46 \pm 7,03$ ; CEE:  $93,60 \pm 9,27$ ), quando comparado com o grupo FO sem exercício (CED:  $144,8 \pm 9,84$ ; CEE:  $168,0 \pm 9,53$ ) e FO com exercício (CED:  $171,8 \pm 14,91$ ; CEE:  $161,3 \pm 14,39$ ), que mostraram valores de HVA semelhantes. Constatou-se, no grupo 6-OHDA com exercício (CED:  $75,11 \pm 9,32$ ; CEE:  $105,0 \pm 10,20$ ), um aumento significativo, quando comparado com o grupo lesionado sem exercício (Figuras 25).

Figura 23 – Efeito do exercício físico sobre as concentrações estriatais de DA, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

A



B

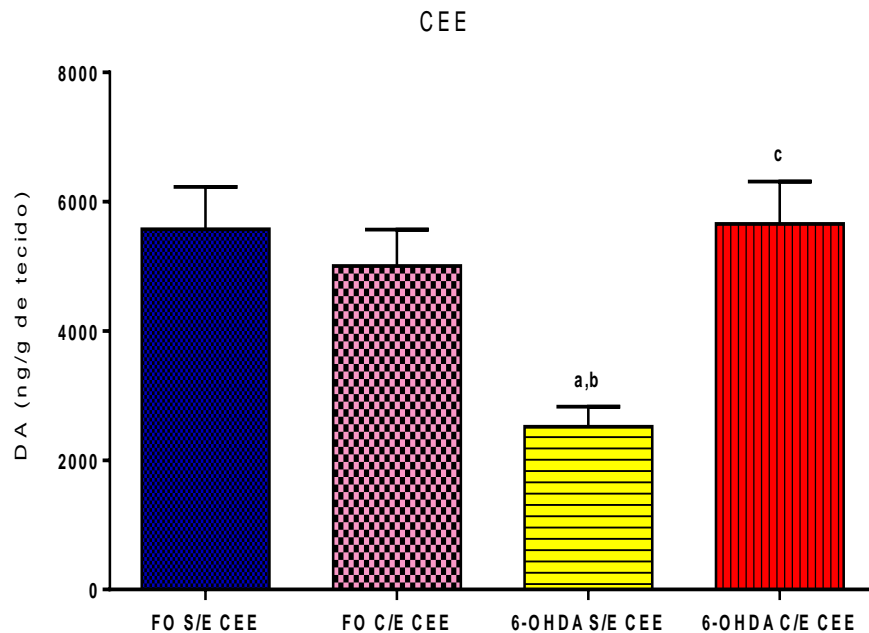


Figura (A) representa corpo estriado direito (CED), (B) corpo estriado esquerdo (CEE). Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 9-15$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E), c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 24 – Efeito do exercício físico sobre as concentrações estriatais de DOPAC, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

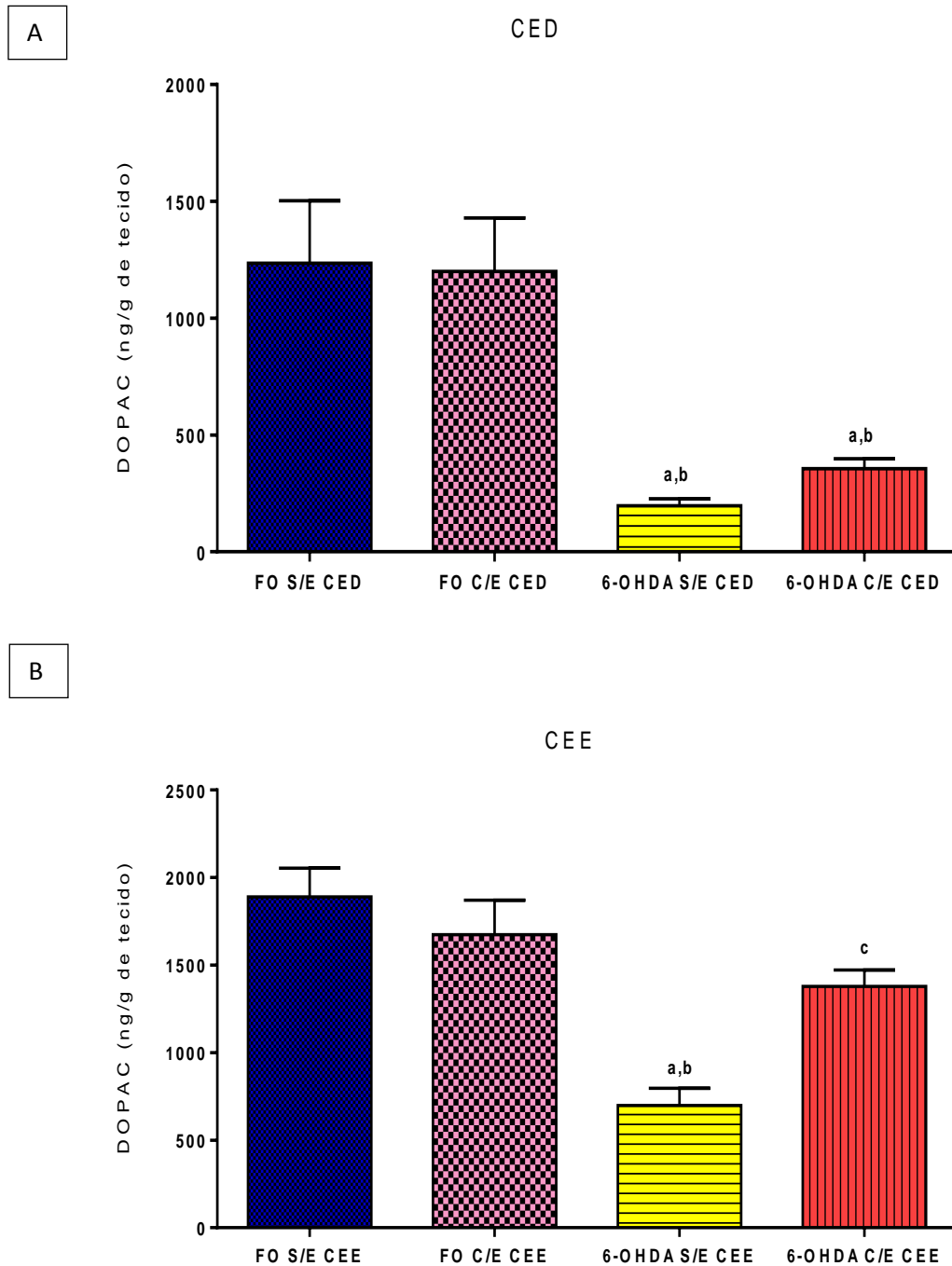


Figura (A) representa corpo estriado direito (CED), (B) corpo estriado esquerdo (CEE). Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 9-10$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E), c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 25 – Efeito do exercício físico sobre as concentrações estriatais de HVA, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

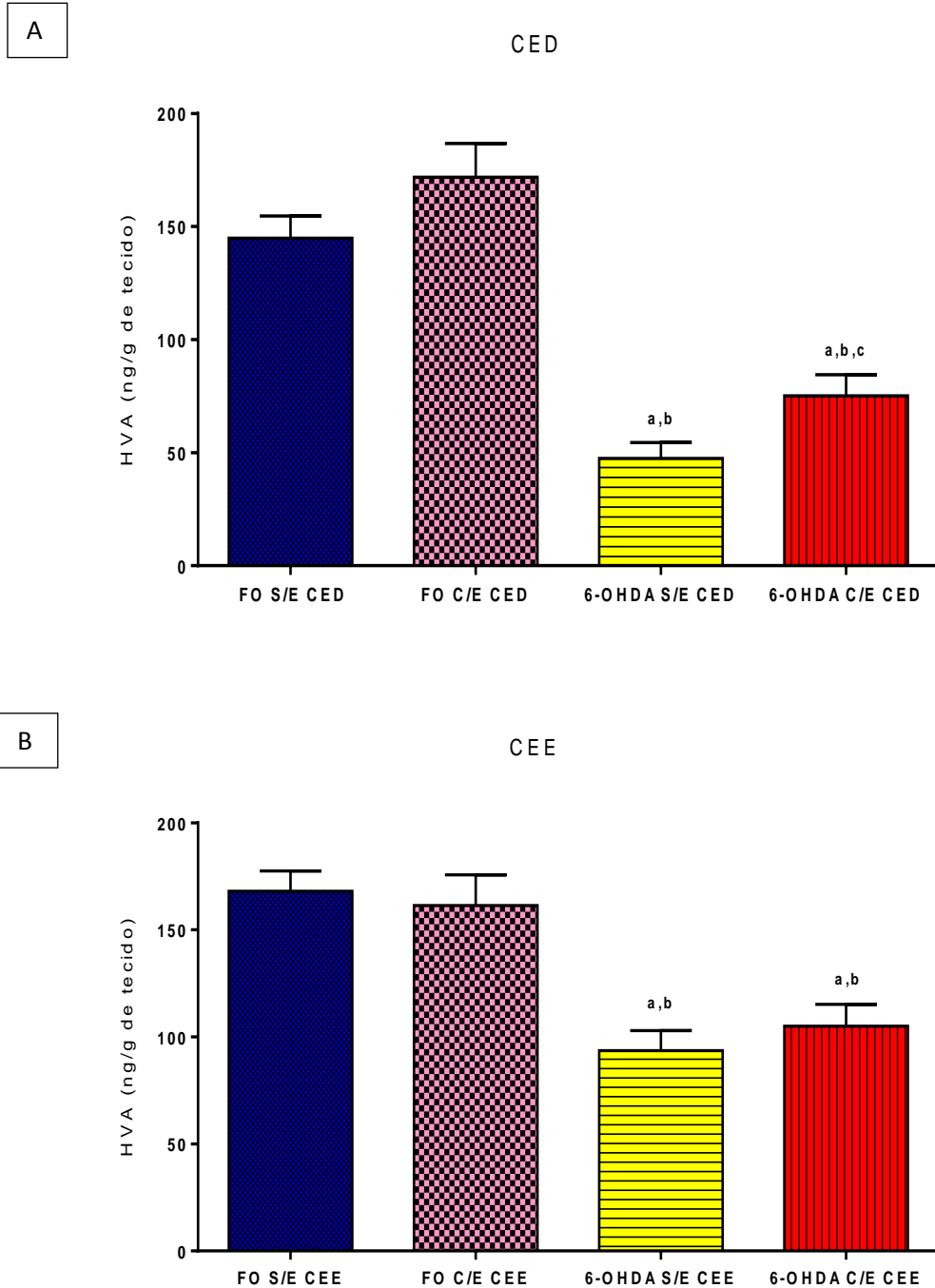


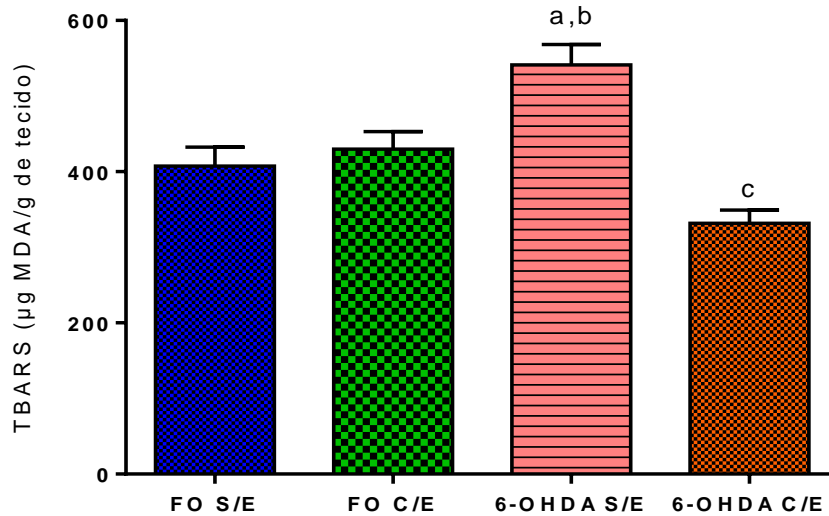
Figura (A) representa corpo estriado direito (CED), (B) corpo estriado esquerdo (CEE). Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 7-15$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E), c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

### **5.8 Efeito do exercício físico em esteira na peroxidação lipídica (TBARS) em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos lesionados com 6-OHDA**

A peroxidação lipídica foi avaliada através da determinação de TBARS, com a finalidade de demonstrar a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA e os efeitos do exercício físico sobre o estresse oxidativo. Observou-se que, no grupo 6-OHDA sem exercício, a exposição das células do CPF e HC ocasionou um aumento no conteúdo de MDA (CPF:  $541,4 \pm 26,86$ ; HC:  $445,4 \pm 15,20$ ), quando comparado com o grupo FO sem exercício (CPF:  $407,2 \pm 25,34$ ; HC:  $356,8 \pm 22,91$ ) e FO com exercício (CPF:  $429,9 \pm 23,22$ ; HC:  $331,5 \pm 13,97$ ). O grupo 6-OHDA com exercício apresentou uma diminuição significativa nos níveis de MDA (CPF:  $331,9 \pm 17,55$ ; HC:  $332,3 \pm 15,11$ ) (Figuras 26 e 27).

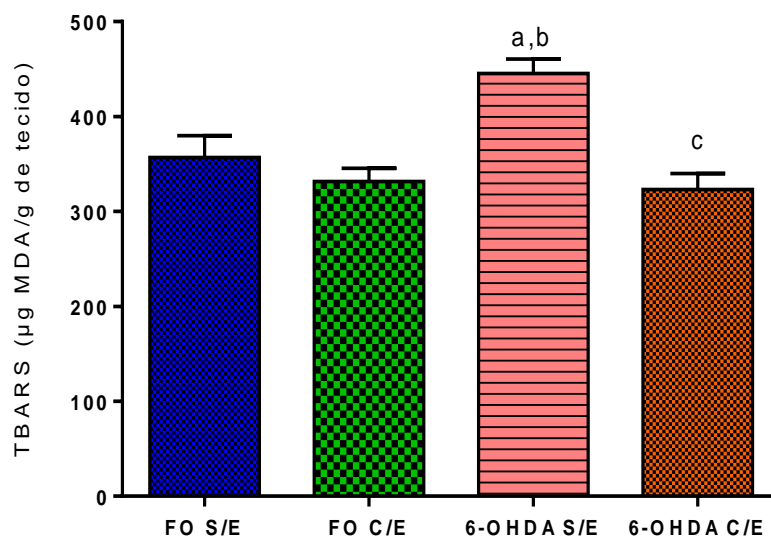
Quanto ao CE, no grupo 6-OHDA sem exercício, evidenciou-se um aumento no conteúdo de MDA do lado lesionado (CED:  $562,1 \pm 20,62$ ), quando comparado com o grupo FO sem exercício (CED:  $452,0 \pm 28,87$ ; CEE:  $343,1 \pm 14,44$ ) e FO com exercício (CED:  $436,1 \pm 31,25$ ; CEE:  $238,9 \pm 37,47$ ). No grupo 6-OHDA submetido ao exercício, constataram-se expressivas reduções nos níveis de MDA no CED ( $442,5 \pm 31,95$ ) (Figura 28).

Figura 26 - Efeito do exercício físico na peroxidação lipídica (TBARS) de córtex pré-frontal (CPF), em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 7-14 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 27- Efeito do exercício físico na peroxidação lipídica (TBARS) em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 9-14 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 28 – Efeito do exercício físico na peroxidação lipídica (TBARS) em corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

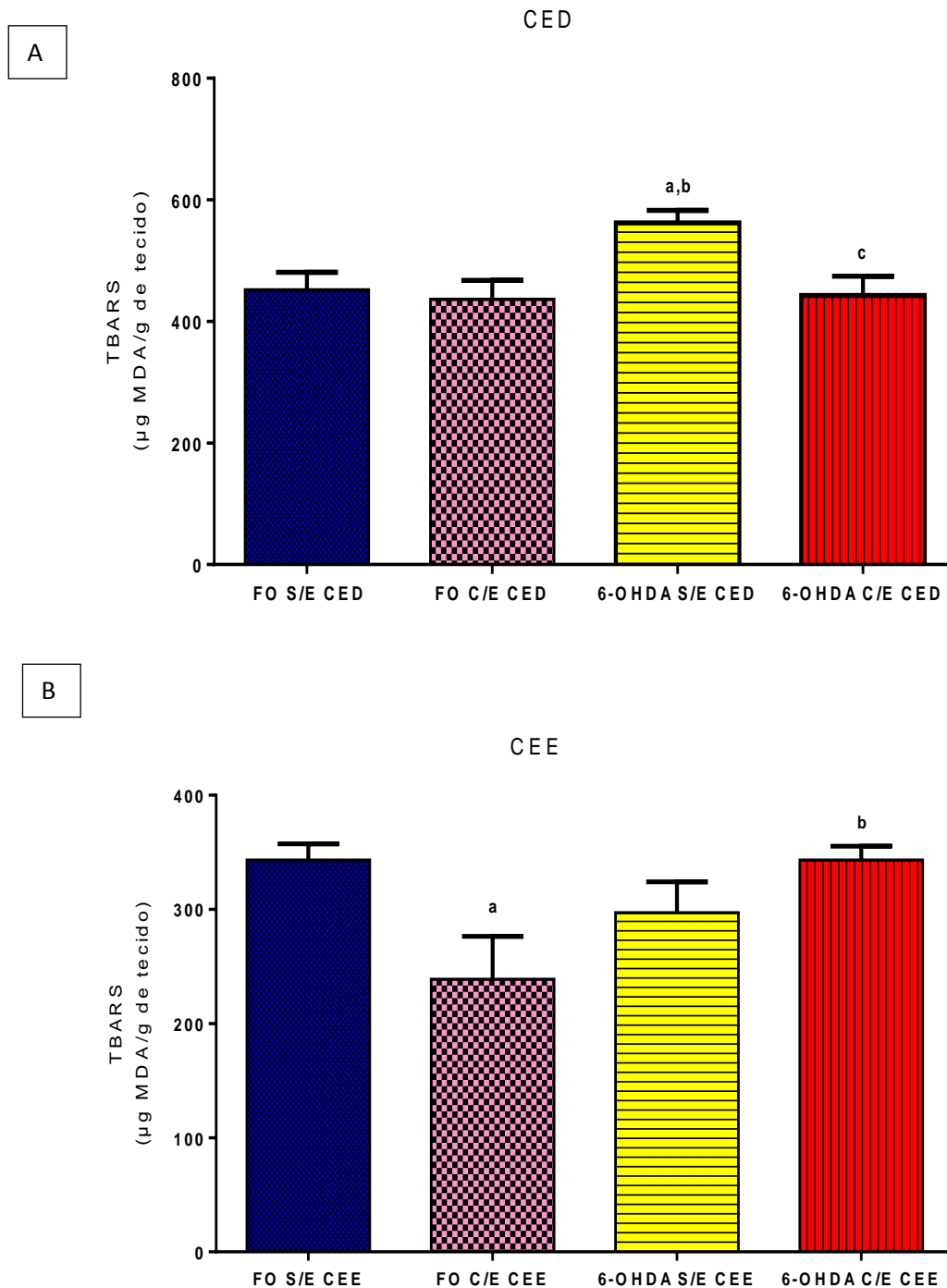


Figura (A) representa corpo estriado direito (CED), (B) corpo estriado esquerdo (CEE). Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 8-11 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E), c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

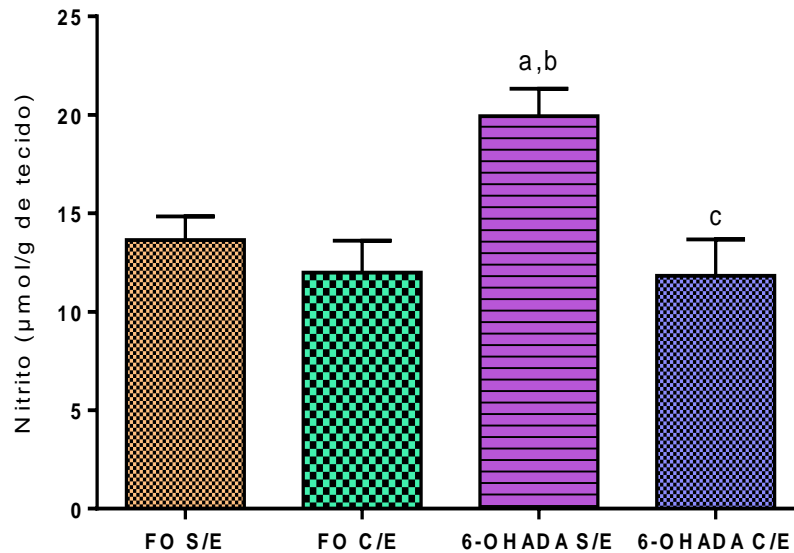


### **5.9 Efeito do exercício físico em esteira sobre dosagem de nitrito/nitrato em pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos lesionados com 6-OHDA**

Os resultados mostraram que as concentrações de nitrito/nitrato no grupo 6-OHDA sem exercício aumentaram no CPF e HC (CPF:  $19,94 \pm 1,38$ ; HC:  $32,02 \pm 1,81$ ), quando comparadas ao grupo FO sem exercício (CPF:  $13,65 \pm 1,20$ ; HC:  $22,55 \pm 3,31$ ). Entretanto, o grupo 6-OHDA com exercício (CPF:  $11,84 \pm 1,83$ ; HC:  $19,94 \pm 1,14$ ) e FO com exercício (HC:  $11,49 \pm 2,06$ ) apresentaram uma redução significativa nas concentrações de nitrito/nitrato após aplicação do protocolo (Figuras 29 e 30).

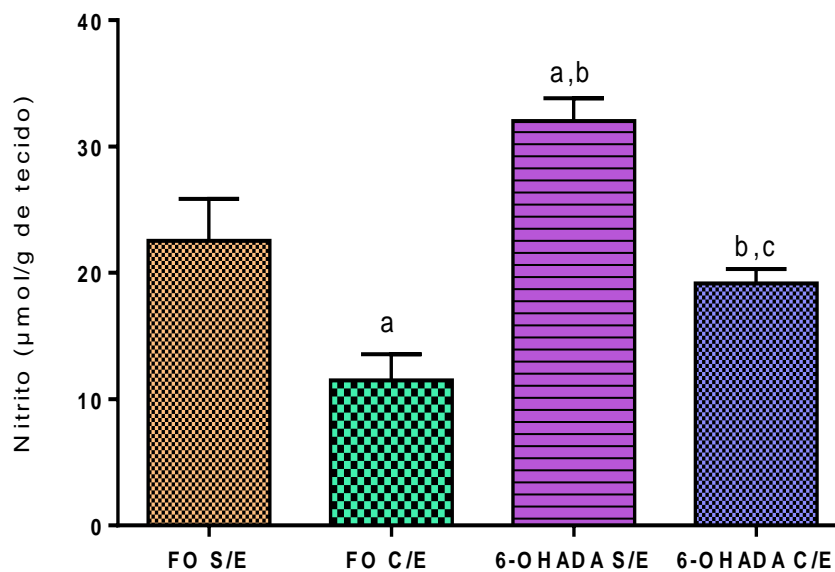
Com relação ao CE, verificou-se que o grupo 6-OHDA sem exercício, incidiu um aumento na concentração de nitrito/nitrato no CED ( $50,00 \pm 6,03$ ), quando comparado com o grupo FO sem exercício (CED:  $26,55 \pm 2,91$ ; CEE:  $31,29 \pm 1,92$ ) e FO com exercício (CED:  $16,47 \pm 2,143$ ; CEE:  $24,53 \pm 3,75$ ). No grupo 6-OHDA com exercício físico, percebeu-se uma diminuição, no CED ( $22,65 \pm 4,71$ ) e CEE ( $20,80 \pm 3,25$ ) (Figura 31).

Figura 29 – Efeito do exercício físico sobre dosagem de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n= 10-16 animais por grupo) a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 30 – Efeito do exercício físico sobre dosagem de nitrito/nitrato em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n= 7-11 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 31 – Efeito do exercício físico sobre dosagem de nitrito/nitrato em corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

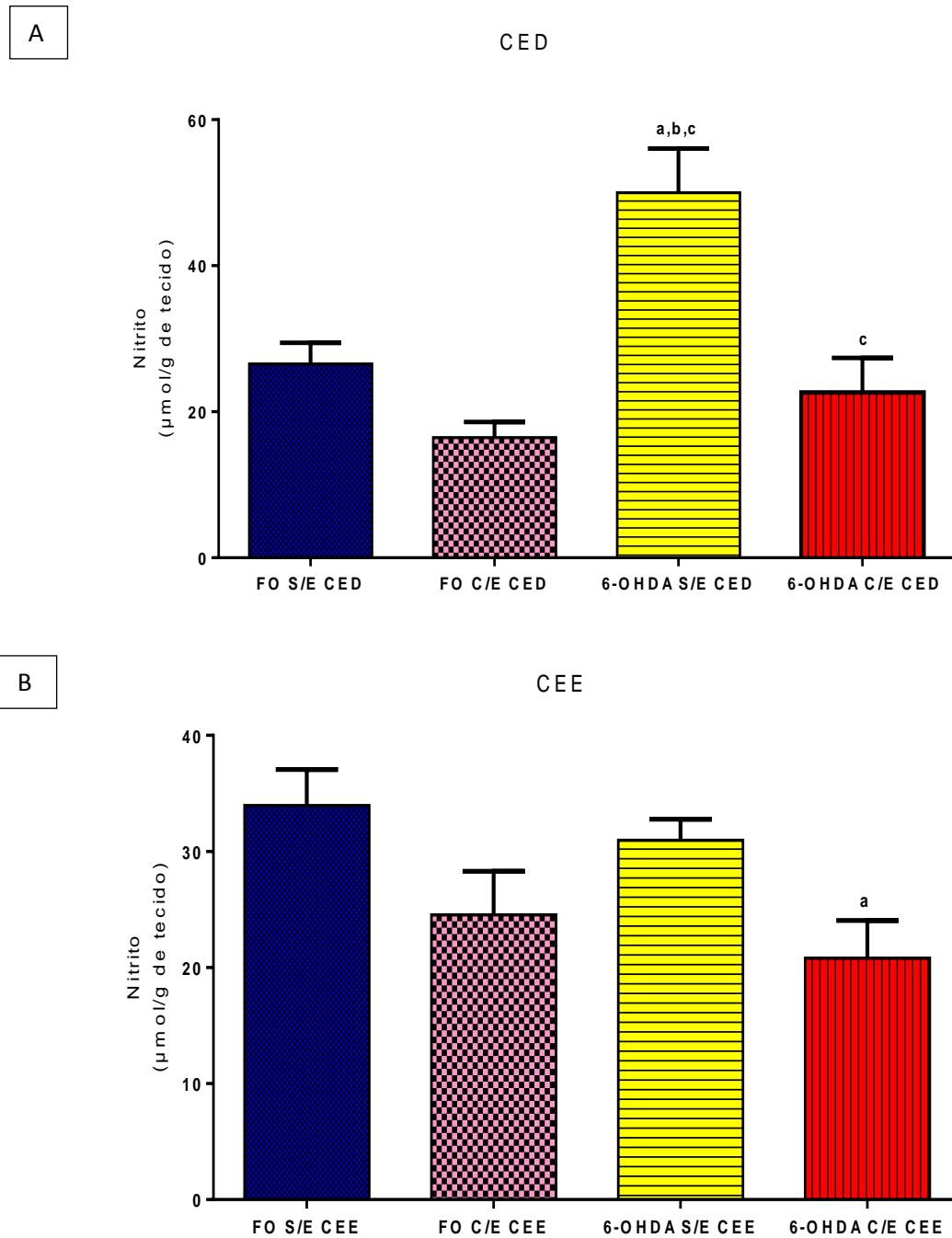


Figura (A) representa corpo estriado direito (CED), (B) corpo estriado esquerdo (CEE). Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 6-10$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E), c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

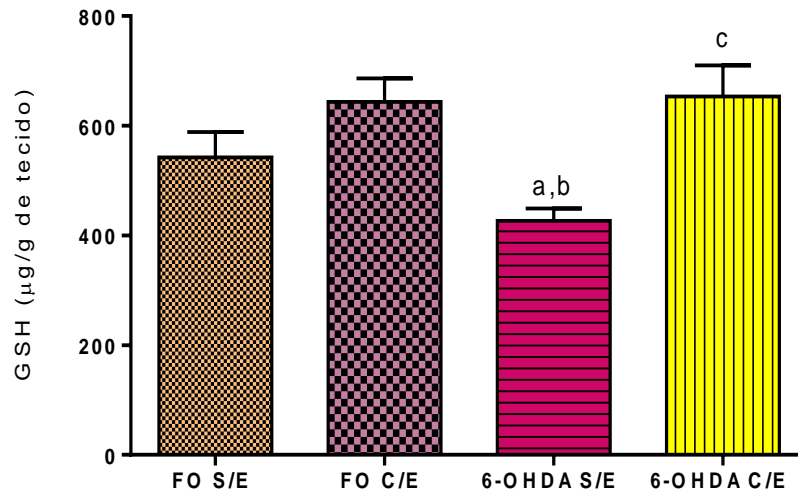
### **5.10 Efeito do exercício físico em esteira sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em corte pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos lesionados com 6-OHDA**

A glutathiona, um tripeptídeo (g-L-glutamil-cisteinil-glicina), permanece no organismo nas formas de GSH e GSSG, agindo diretamente em processos biológicos importantes, incluindo metabolismo e proteção celular. Os resultados evidenciaram que as concentrações de GSH no grupo 6-OHDA sem exercício diminuíram no CPF ( $426,7 \pm 22,50$ ), quando comparado ao grupo FO sem exercício (CPF:  $542,0 \pm 46,39$ ) e FO com exercício (CPF:  $643,8 \pm 42,63$ ). Entretanto, o grupo lesionado e submetido ao protocolo de exercício (6-OHDA (C/E):  $653,6 \pm 56,58$ ) apresentou um aumento significativo nas concentrações de GSH (Figura 32).

Em relação às concentrações de GSH no HC, o grupo 6-OHDA sem exercício apresentou diminuição ( $511,1 \pm 13,48$ ) em relação ao FO sem exercício ( $829,6 \pm 64,13$ ). Essa mesma redução nas concentrações de GSH foi observada nos grupos 6-OHDA com exercício ( $599,4 \pm 34,62$ ) e FO com exercício ( $580,2 \pm 26,87$ ) (Figura 33).

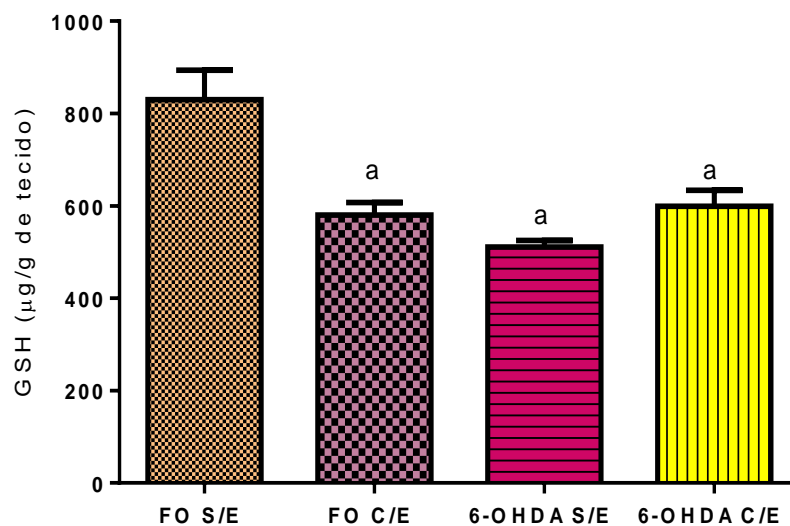
Observamos que no CE, não ocorreu diferenças significativas na concentração de GSH entre os grupos que realizou exercícios e os controles (Figura 34).

Figura 32 – Efeito do exercício físico sobre as concentrações de GSH em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n= 9-15 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E) e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 33 – Efeito do exercício físico sobre as concentrações de GSH em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 7-12 animais por grupo). a.  $p \leq 0,05$  quando comparados aos grupos FO sem exercício (S/E). (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 34 – Efeito do exercício físico sobre as concentrações de GSH em corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

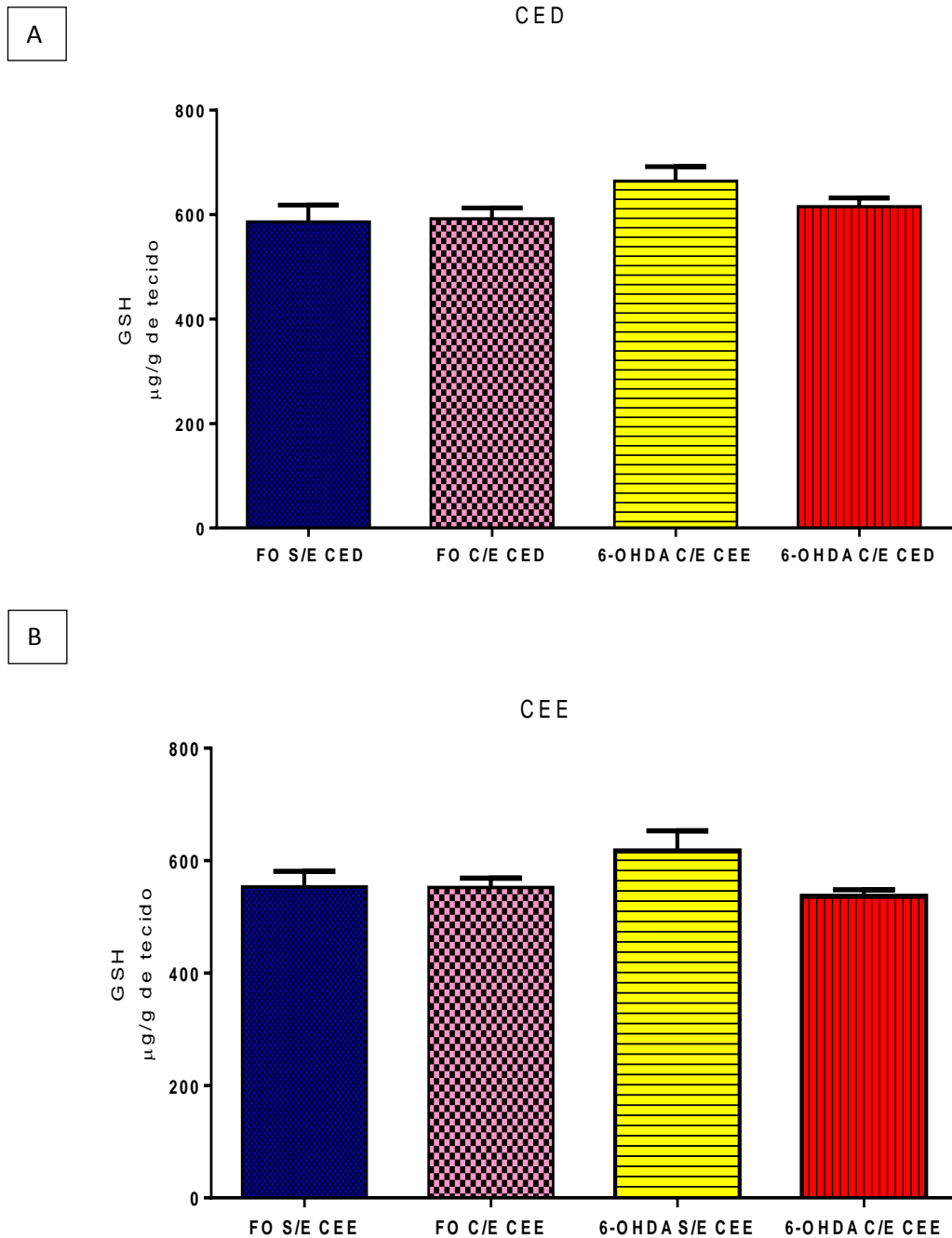


Figura (A) representa corpo estriado direito (CED), (B) corpo estriado esquerdo (CEE). Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 12-14 animais por grupo).  $p < 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

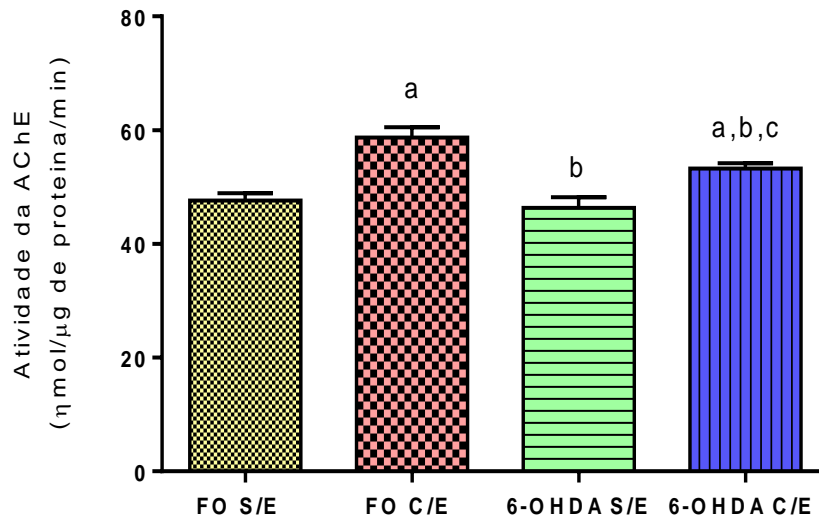
### **5.11 Efeito do exercício físico em esteira sobre determinação da atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos lesionados com 6-OHDA**

Os resultados evidenciaram um aumento nas concentrações de AChE no CPF dos grupos 6-OHDA com exercício ( $53,23 \pm 0,98$ ) e FO com exercício ( $58,69 \pm 1,83$ ), quando comparados aos grupo 6-OHDA sem exercício ( $46,31 \pm 1,91$ ), grupo FO sem exercício ( $47,63 \pm 1,28$ ). Foram encontradas diferenças nos grupos 6-OHDA sem e com exercício (Figura 35).

As concentrações de AChE no HC do grupo 6-OHDA sem exercício ( $8,65 \pm 1,00$ ), FO com exercício ( $7,06 \pm 1,05$ ) e 6-OHDA com exercício ( $5,34 \pm 0,28$ ) apresentaram diminuição significativa, em relação ao grupo FO sem exercício ( $11,34 \pm 1,17$ ) (Figura 36).

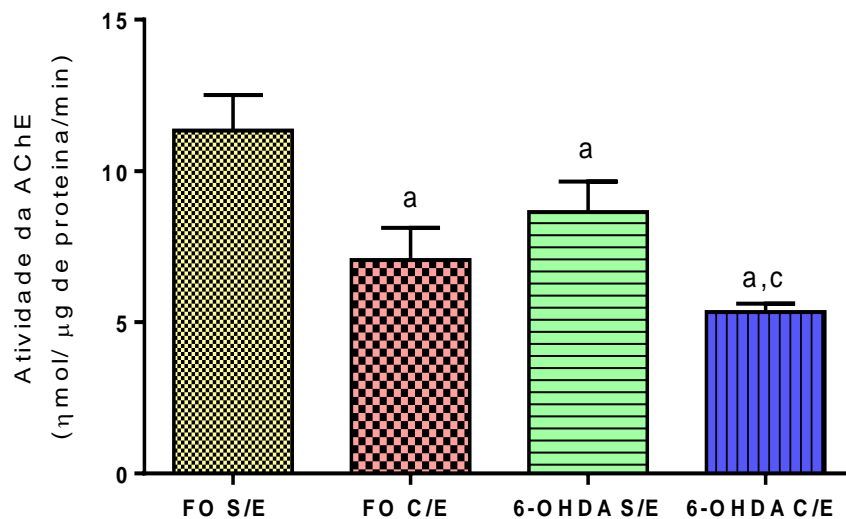
No CE, observou-se que as concentrações de AChE no grupo 6-OHDA sem exercício CED ( $10,48 \pm 0,60$ ), CEE ( $9,68 \pm 0,90$ ), FO com exercício CED ( $6,67 \pm 0,91$ ), CEE ( $9,34 \pm 1,32$ ) e 6-OHDA com exercício CED ( $7,63 \pm 0,66$ ), CEE ( $9,34 \pm 0,59$ ) exibiram redução significativa, quando comparados ao grupo FO sem exercício CED ( $14,01 \pm 1,31$ ), CEE ( $15,48 \pm 0,91$ ). Não foram encontradas diferenças significativas nos grupos 6-OHDA sem e com exercício (Figura 37).

Figura 35 – Efeito do exercício físico sobre a atividade da AChE em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 8-19 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício, c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 36 – Efeito do exercício físico sobre a atividade da AChE em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

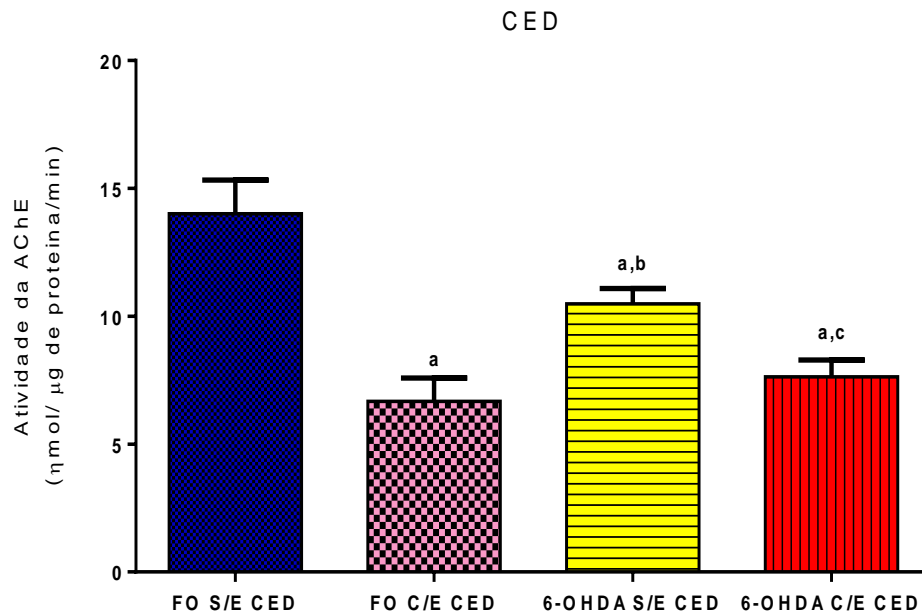


Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 6-8 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).



Figura 37– Efeito do exercício físico sobre a atividade da AChE em corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

A



B

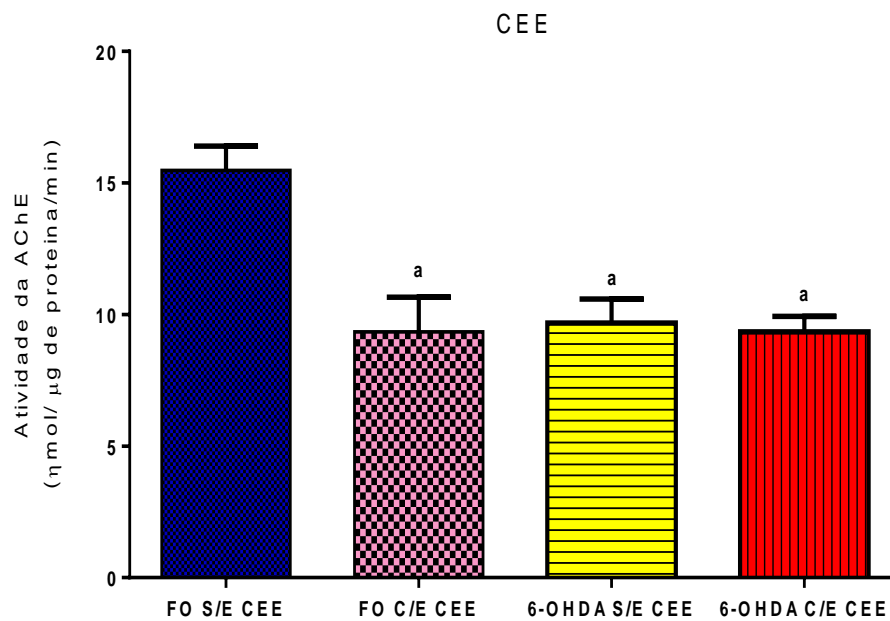


Figura (A) representa corpo estriado direito (CED), (B) corpo estriado esquerdo (CEE). Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 8-9$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E), c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

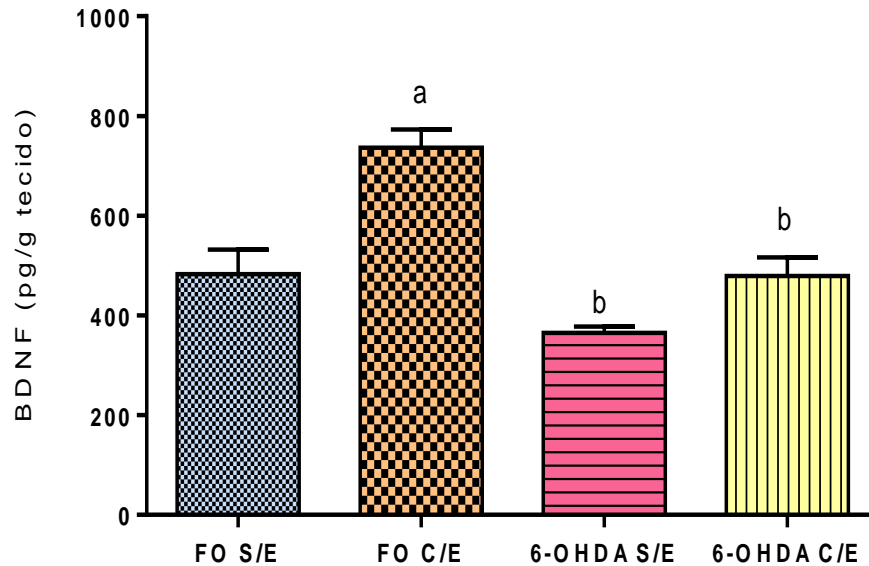
### **5.12 Efeito do exercício físico em esteiranas concentrações do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos lesionados com 6-OHDA**

As concentrações de BDNF no CPF dos grupos 6-OHDA sem exercício ( $365,3 \pm 12,48$ ), FO sem exercício ( $483,1 \pm 48,69$ ) e 6-OHDA com exercício ( $479,3 \pm 37,30$ ) não apresentaram diferenças significativas, quando comparados entre si. Contudo, o grupo FO com exercício ( $736,5 \pm 36,56$ ) incidiu um aumento na concentração de BDNF após aplicação do protocolo de exercício (Figura 38).

No HC, as concentrações de BDNF no grupo 6-OHDA sem exercício ( $1659 \pm 112,7$ ) apresentou uma redução quando comparado ao FO sem exercício ( $1917 \pm 28,58$ ). Porém nos grupos submetidos ao protocolo de exercício foi possível evidenciar um aumento nas concentrações de BDNF (FO (C/E):  $2794 \pm 72,57$ ; 6-OHDA (C/E):  $2061 \pm 105,7$ ) (Figura 39).

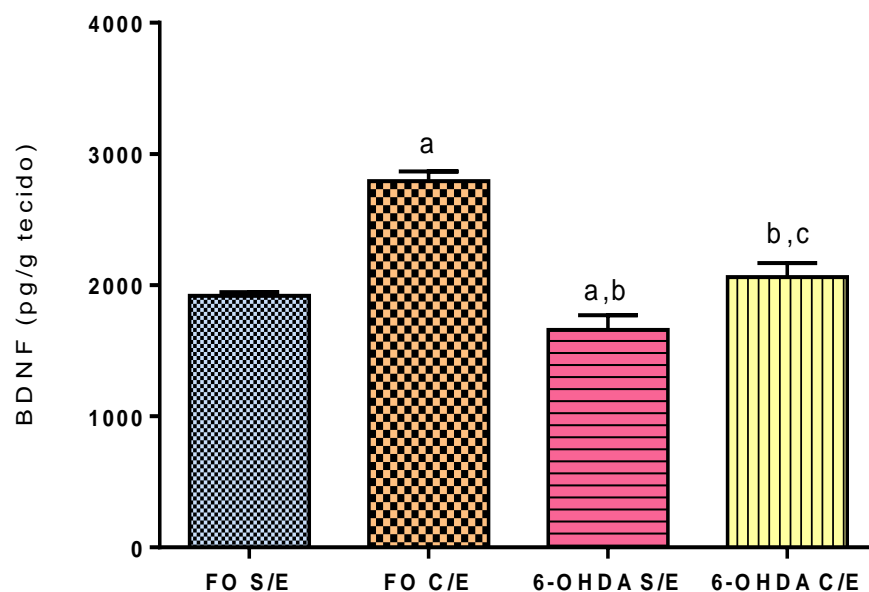
Quanto ao CE no grupo 6-OHDA sem exercício, observou-se uma redução nas concentrações de BDNF (CED:  $363,9 \pm 34,69$ ; CEE:  $483,9 \pm 24,68$ ), revelando diferenças em relação ao grupo FO sem exercício (CED:  $725,2 \pm 47,70$ ; CEE:  $540,2 \pm 58,50$ ). Nos grupos FO com exercício (CED:  $868,6 \pm 37,90$ ; CEE:  $841,8 \pm 48,15$ ) e 6-OHDA com exercício (CED:  $559,5 \pm 34,19$ ; CEE:  $549,3 \pm 24,57$ ), ocorreu um aumento na concentração de BDNF após aplicação do protocolo de exercício físico (Figura 40).

Figura 38 – Efeito do exercício físico nas concentrações de BDNF em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 6-9 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO sem exercício (S/E)  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 39 – Efeito do exercício físico nas concentrações de BDNF em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 7-10 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO sem exercício (S/E), c. vs 6-OHDA (S/E)  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

Figura 40 – Efeito do exercício físico nas concentrações de BDNF em corpo estriado direito (CED) e esquerdo (CEE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.

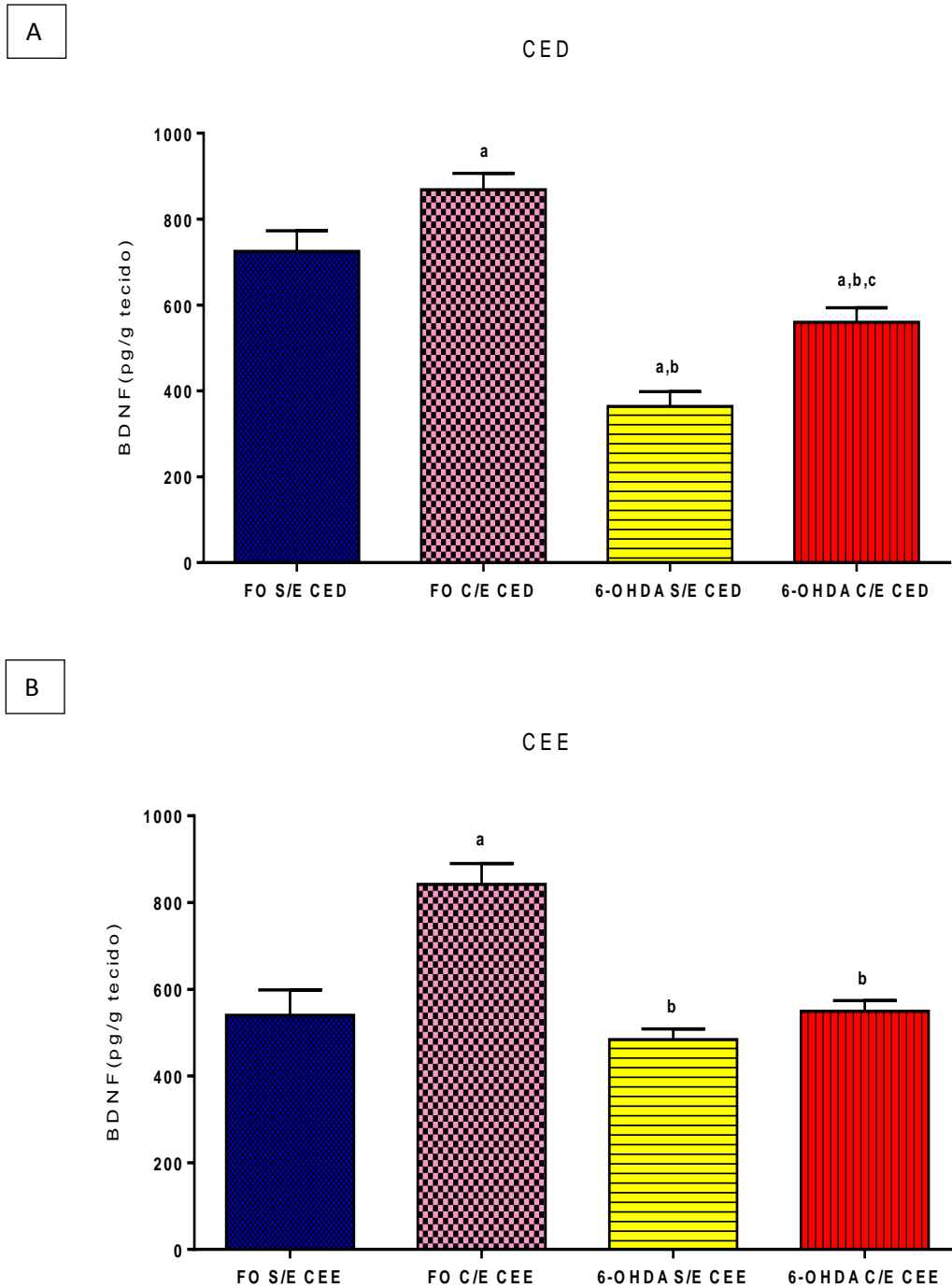


Figura (A) representa corpo estriado direito (CED), (B) corpo estriado esquerdo (CEE). Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 8-9$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E), c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E),  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

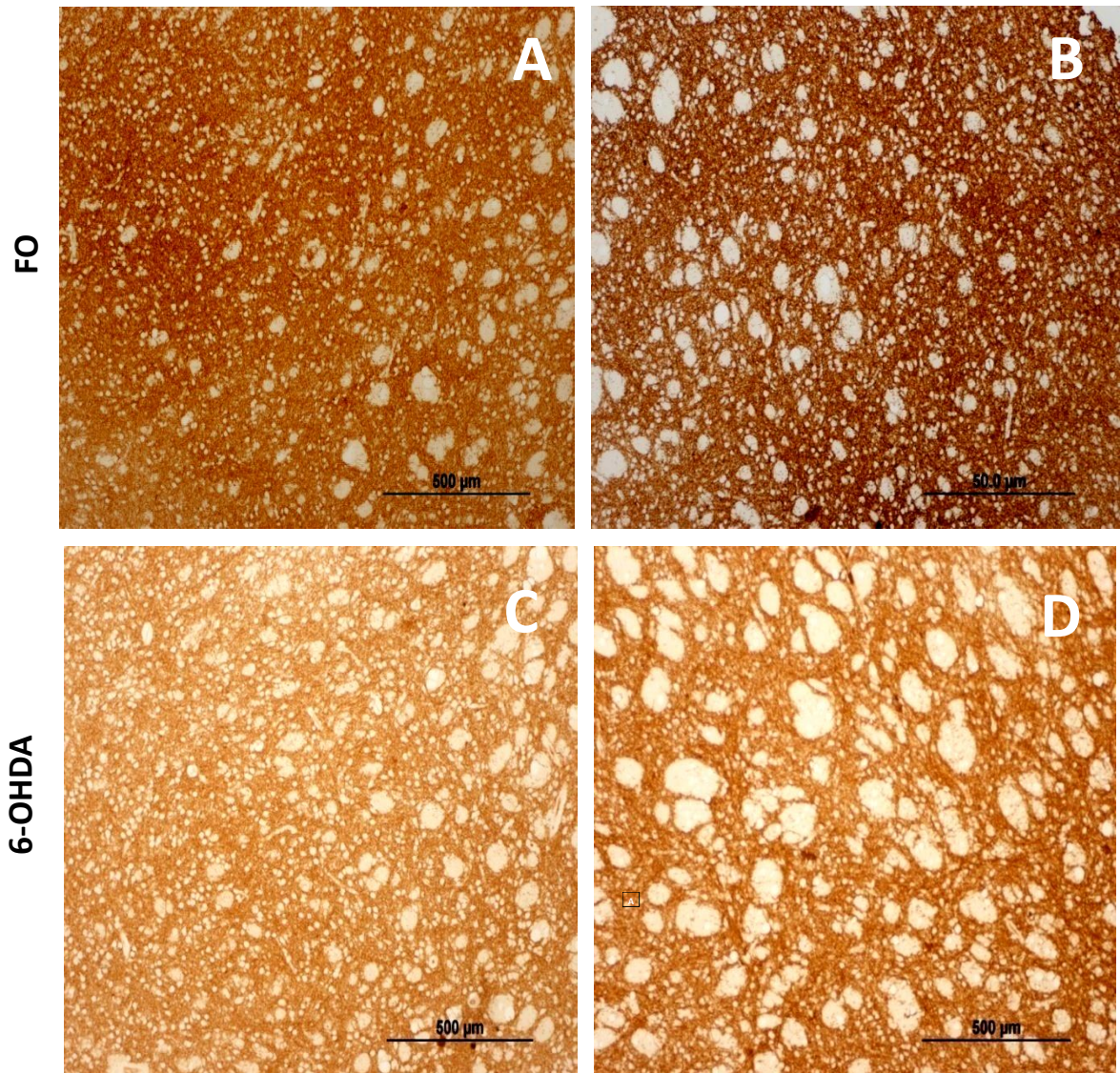
### **5.13 Efeito do exercício físico emesteira sobre a imunorreatividade para a tirosina hidroxilase (TH) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

Os neurônios dopaminérgicos contem a enzima TH, um catalisador do primeiro passo da síntese de catecolaminas, que realiza a conversão da tirosina em L-Dopa, que por sua vez é convertida em DA, pela ação da enzima dopa descarboxilase. A enzima é também considerada um biomarcador em modelos de DP. Assim, a DP pode ser considerada uma síndrome estriatal com deficiência de TH. Nesse estudo foram detectadas diferenças na intensidade de marcação da TH no grupo 6-OHDA sem exercício em relação ao FO sem exercício. Por outro lado, o protocolo de exercício atenuou essa perda de TH (Figura 41).

Foi realizada uma análise semi-quantitativa de densidade óptica (DO) das imagens digitalizadas dos cortes histológicos imunomarcados para TH através do *software imageJ* (*National Institutes of Health, USA*).

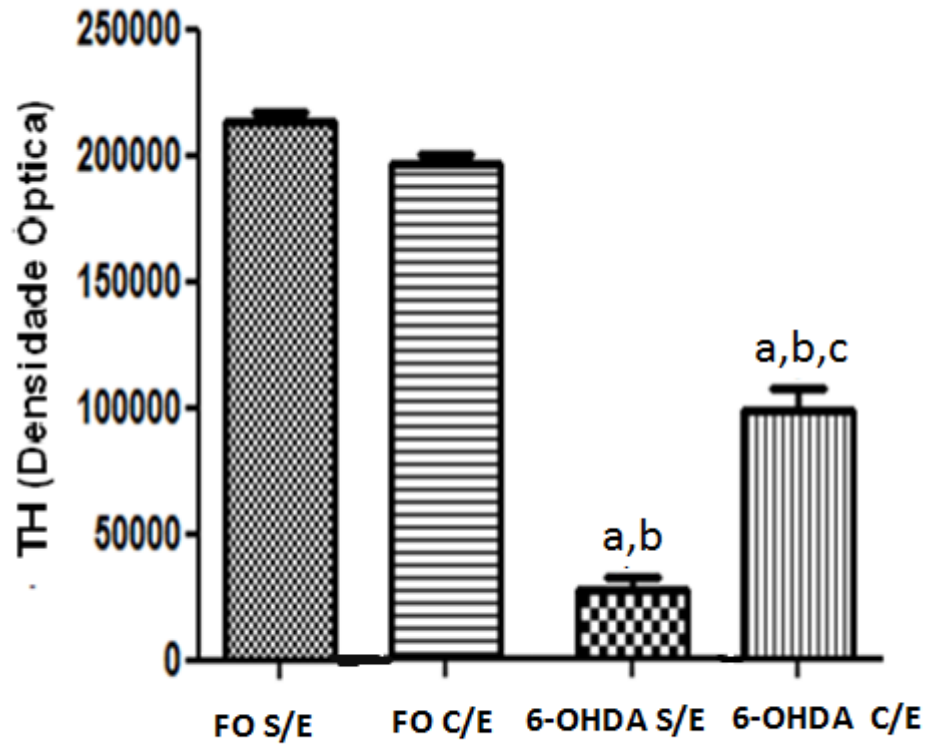
Após o cálculo da porcentagem de DO, os resultados mostraram que, enquanto o grupo FO quase não apresentou alteração, o grupo 6-OHDA com exercício apresentou uma diminuição na porcentagem DO na imunomarcção para TH. Contudo, o protocolo de exercício protegeu parcialmente a perda de TH (Figuras 42).

Figura 41 – Fotomicrografias representativas de neurônios imunorreativos para Tirosina Hidroxilase (TH) em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício.



Fotomicrografia representativa de neurônios imunorreativos para TH no CED de ratos submetidos a lesão estriatal e protocolo de exercício. Coloração marron representa células imunorreativas a TH ao longo do CE. A- FO sem exercício, B - FO com exercício, C - 6-OHDA sem exercício e D - 6-OHDA com exercício. Aumento de 100 vezes. Escala 500μm.

Figura 42 – Quantificação da imunomarcção para Tirosina Hidroxilase (TH) no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM ( $n = 6$  animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E), c. vs 6-OHDA (S/E)  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

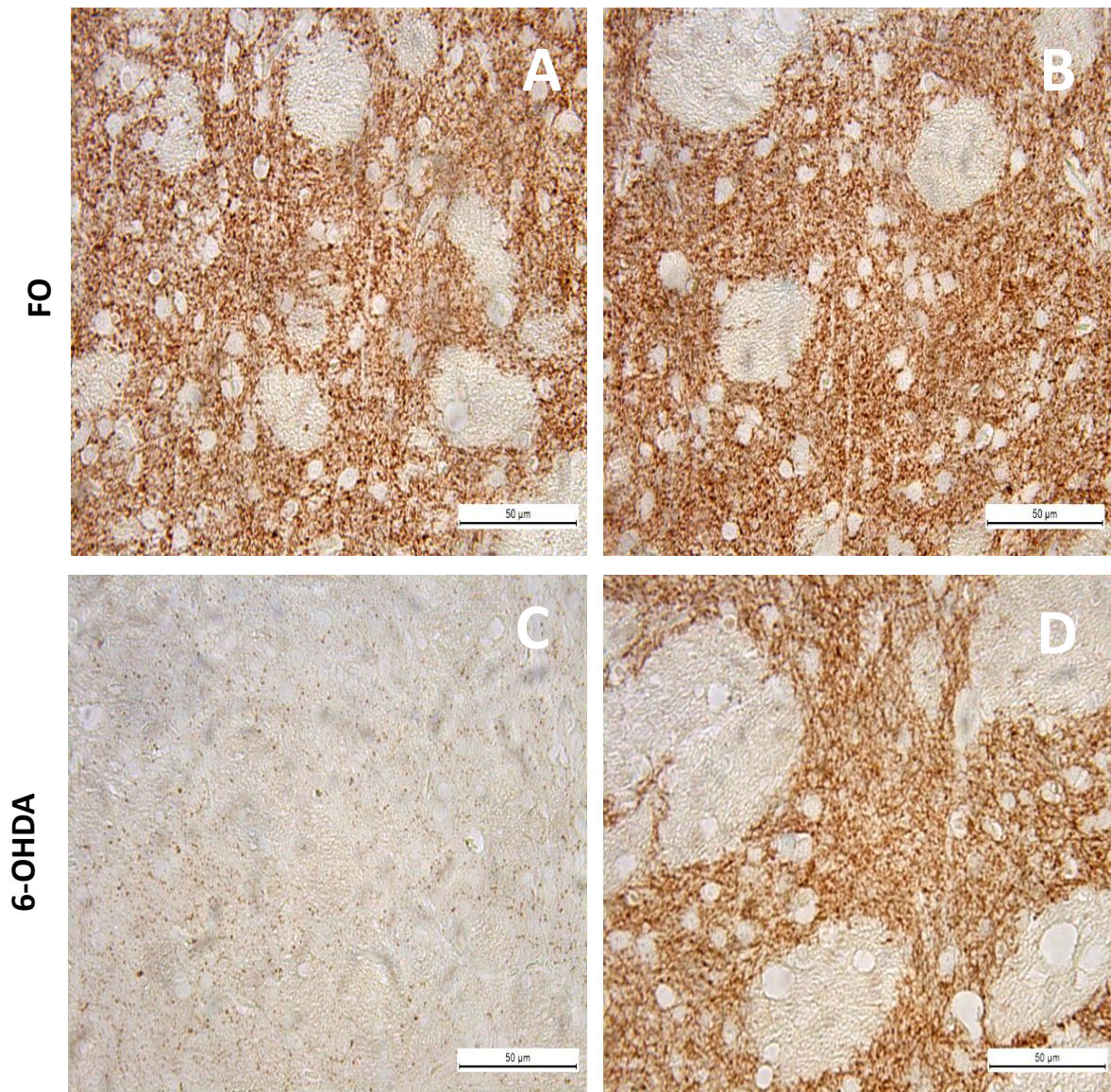
#### **5.14 Efeito do exercício esteira sobre a atividade do transportador de dopamina (DAT) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

A dopamina é liberada na fenda sináptica por exocitose ou por ação reversa de seu transportador dopaminérgico (DAT – dopamine transporter). O DAT modula a concentração sináptica de dopamina nos terminais pré-sinápticos dos neurônios dopaminérgicos através de mecanismo acoplado ao Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Uma vez liberada, a dopamina não sofre degradação na fenda sináptica. Setenta por cento da dopamina removida da fenda sináptica no neostriado acontece por meio da recaptura pré-sináptica pelo DAT. Os outros 30% são metabolizados pela enzima citoplasmática catecol-O-metiltransferase (COMT) (PURVES *et al.*, 2004; SAPER, 2000). Na DP há diminuição na densidade de DAT no neostriado devido à perda dos terminais dopaminérgicos (STORCH *et al.*, 2006).

A Figura 43 mostra as diferenças na intensidade de marcação da DAT no grupo 6-OHDA sem exercício em relação ao FO sem exercício, enquanto no grupo 6-OHDA com exercício atenuou a redução de DAT.

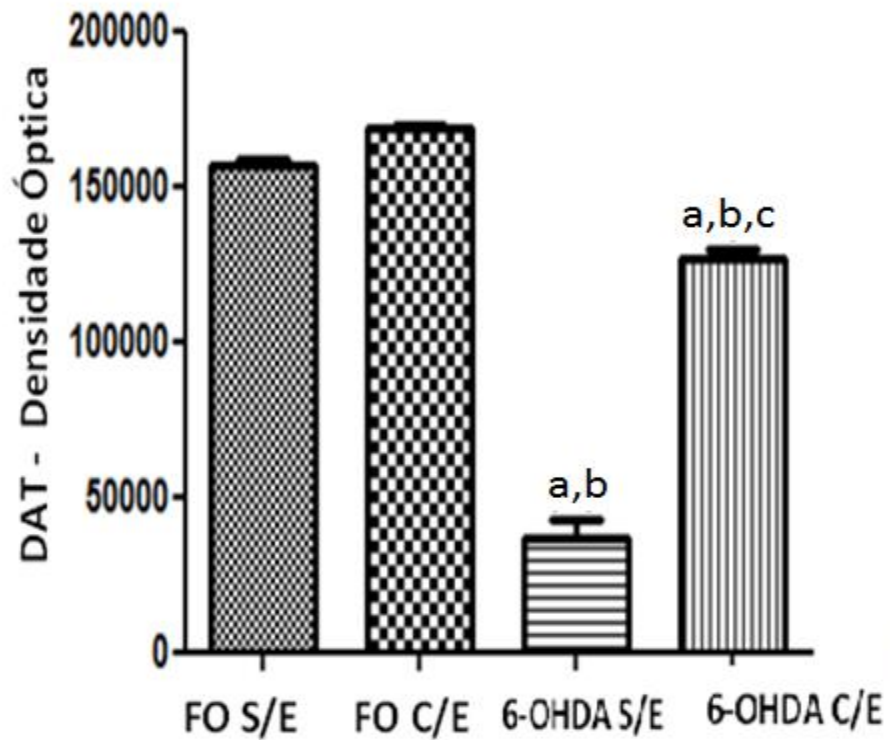


Figura 43 – Fotomicrografias de cortes estriais marcados pela imunoreatividade para DAT em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício.



Fotomicrografia representativa de neurônios imunorreativos para DAT no CED de ratos submetidos a lesão estriatal e protocolo de exercício. Coloração marron representa células imunorreativas a TH ao longo do CE. A - FO sem exercício, B - FO com exercício, C - 6-OHDA sem exercício e D - 6-OHDA com exercício. Aumento de 400 vezes. Escala 50 µm.

Figura 44 – Quantificação da imunomarcagem para dopamina (DAT) no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício.



Cada barra representa média  $\pm$  EPM (n = 7-10 animais por grupo). a. vs FO sem exercício (S/E), b. vs FO com exercício (C/E), c. vs 6-OHDA (S/E)  $p \leq 0,05$ . (ANOVA e *Student Newman Keuls*).

## 6 DISCUSSÃO

O exercício físico tem sido identificado como uma alternativa preventiva e terapêutica para minimizar os sintomas motores e não-motores da DP, além de proteger contra degeneração de neurônios dopaminérgicos (SPEELMAN *et al.*, 2011). Estudos envolvendo modelos animais da DP, com o emprego de paradigmas distintos de exercício, têm tentado explicar os mecanismos moleculares das mudanças induzidas por exercício na fisiopatologia, uma vez que a extensão da lesão e o tipo de exercício (voluntário ou forçado) podem afetar o grau de neuroproteção e melhoria comportamental (ALONSO-FRECH *ET al.*, 2011; HIRSCH; FARLEY, 2009).

O presente estudo avaliou os possíveis efeitos do exercício físico no modelo experimental de DP induzida pela injeção unilateral estriatal de 6-OHDA, em ratos. Esta neurotoxina, desde a sua primeira descrição em 1959, tem desempenhado um papel fundamental na pesquisa pré-clínica. A 6-OHDA é um análogo estrutural de catecolaminas, DA e NA, e exerce os seus efeitos tóxicos sobre neurônios catecolaminérgicos (SIMOLA; MORELLI, 2007). Promove destruição nigroestriatal, resultando na diminuição dos níveis de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA), sendo responsável por grande parte dos distúrbios motores presentes na doença (AGUIAR, L., 2009; AHMAD *et al.*, 2012).

Os nossos resultados mostraram que o treinamento físico em esteira, pelo período de 14 dias consecutivos, com sessões diárias de 30 minutos em intensidade moderada, melhorou o desempenho dos animais nos aspectos comportamentais e neuroquímicos. O período e o tempo de exercício (minutos/semana) utilizados nesta pesquisa já se mostraram efetivos em outros estudos (CHEN *et al.* 2005, COHEN *et al.*, 2003; TILLERSON *et al.*, 2003 *apud* CHO *et al.*, 2013; YOON *et al.*, 2007).

Foram evidenciadas alterações comportamentais em ratos após a injeção unilateral de 6-OHDA no CE, ocasionado pelo aumento das rotações induzidas por apomorfina. Quando animais são unilateralmente lesionados por 6-OHDA, apresentam atividade rotacional após administração de drogas, tais como anfetaminas, apomorfina e metilfenidato. Estas induzem atividade rotacional, sendo um indicador de depleção de DA (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970). Este comportamento estereotipado ocorre em consequência da perda de neurônios dopaminérgicos, ocasionando a hipersensibilização de seus receptores, decorrente

da perda dos terminais dopaminérgicos no estriado lesionado com 6-OHDA (AGUIAR, L., 2009). Entretanto, no grupo 6-OHDA com exercício físico, estas anormalidades foram revertidas. Resultados similares têm sido descritos e autores sugerem que esta resposta ao exercício reflete um efeito protetor sobre os neurônios dopaminérgicos do CE de ratos, em particular na produção de DA (DUTRA, 2009; JIN *et al.*, 2008; POULTON; MUIR, 2005; TILLERSON *et al.*, 2003; YOON *et al.*, 2007).

A lesão estriatal por 6-OHDA pode causar alterações na atividade locomotora e coordenação motora dos animais, esses parâmetros foram avaliados nesta pesquisa através dos testes *rotarod* e campo aberto (RIZELIO *et al.*, 2010). No teste *rotarod*, o grupo 6-OHDA sem exercício apresentou uma diminuição de permanência na barra giratória, ocasionada pelo aumento no número de quedas, sendo estes efeitos revertidos no grupo 6-OHDA com exercício. Tais dados obtidos foram semelhante a outro anteriormente (GOES *et al.*, 2014). Sugere-se que esses efeitos aconteçam por melhora na coordenação motora e equilíbrio, indicando que realização de exercício físico de caráter rítmico se mostra desencadeador de respostas motoras positivas (GRACIA, 2012). Estudos comprovaram que ratos submetidos ao exercício em esteira 2x/dia, logo após a injeção de drogas que geram o modelo de DP, apresentaram diminuição ou até mesmo ausência de déficits motores, apontando que o exercício foi capaz de gerar efeitos neuroprotetores (TILLERSON *et al.*, 2003). No trabalho realizado por Petzinger e colaboradores (2007), em que foi utilizado o modelo animal de DP induzido por MPTP, demonstrou-se que o exercício em esteira leva ao aumento da latência no teste *rotrod*, por meio de mudanças adaptativas dos núcleos da base (NB) e dos circuitos motores. Deste modo, os resultados desta pesquisa se confirmam com a literatura existente nesta área, pois a lesão com 6-OHDA prejudicou a coordenação motora dos animais, enquanto o exercício aumentou o desempenho geral destes no *rotarod*.

O teste campo aberto incide na mensuração de comportamentos expressos ao se colocar um animal em ambiente novo, tendo como proposta estudar a ação do sistema dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico no comportamento emocional e exploratório. Podem ser avaliados neste teste parâmetros como: atividade locomotora horizontal (número de cruzamento), exploração vertical (*rearing*) e autolimpeza (*grooming*) (ARAÚJO, 2012). Portanto, pode-se destacar a avaliação da atividade motora e do estado emocional dos

animais (FORNAGUERA; SCHWARTING, 1999; MEREDITH; KANG, 2006). Em estudos de parkinsonismo é amplamente utilizado para mensurar o impacto da intervenção lesiva (AGUIAR *et al.*, 2009; CHAO *et al.*, 2012; BARBIEIRO *et al.*, 2011; LUCHTMAN; SHAO; SONG, 2009; PREDIGER *et al.*, 2011; POTHAKOS; KURZ; LAU, 2009; ROJO *et al.*, 2006; SMITH; GOLDBERG; MESHUL, 2011; WINNER *et al.*, 2009).

Verificou-se, nesta pesquisa, que, no grupo 6-OHDA sem exercício, ocorreu uma diminuição significativa da atividade locomotora (números de cruzamento), números de *rearing* e um aumento do número de *grooming*. Trabalhos anteriores reportaram que ratos lesionados por 6-OHDA apresentam déficits motores como consequência da depleção dopaminérgica, de maneira similar à hipocinesia que ocorre em humanos (BROWN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2011). Entretanto, esses efeitos foram amenizados no grupo 6-OHDA submetidos ao exercício. Estes resultados estão em coerência com estudos anteriores (BARROSO, 2012; O'DELL *et al.*, 2007; TILLERSON *et al.*, 2001;. TILLERSON *et al.*, 2003), indicando que o exercício é capaz de atenuar os aspectos comportamentais e déficits motores, além de influenciar a curiosidade exploratória em modelo de DP por 6-OHDA. Torna-se importante destacar que nesta pesquisa os animais submetidos ao protocolo de exercício esteira, comparados aos sedentários, apresentaram melhor desempenho em todos os parâmetros avaliados.

Em conjunto, os resultados obtidos nos testes do *rotarod* e campo aberto sugerem que o exercício é capaz de atenuar os prejuízos motores e a neurodegeneração da via nigroestriatal, induzidos pela administração intraestriatal de 6-OHDA. Além disso, estes resultados reforçam a neuroplasticidade induzida pelo exercício aos NB. Embora os mesmos nos mamíferos tenham sido largamente associados ao comportamento motor, atualmente é sabido que estes núcleos (principalmente o CE) participam da modulação de processos cognitivos (PACKARD; KNOWLTON, 2002; DA CUNHA *et al.*, 2009).

Assim, apesar do amplo espectro dos sintomas motores, está cada vez mais evidente a existência de sintomas não-motores, incluindo déficits cognitivos (AARSLAND *et al.*, 2012; FABBRINI *et al.*, 2013; FRIEDMAN, 2009). Pacientes com DP têm apresentado prejuízos na memória de trabalho (KASTEN *et al.*, 2012; OWEN, 2004), que pode ser ocasionado por reduções da atividade dopaminérgica no CE e no lobo frontal (STEBBINS, 1999). A memória de trabalho ou operacional pode

ser definida como a habilidade cognitiva que permite reter e manipular informações por um curto período de tempo para estímulos ou localizações espaciais, sem a obrigatoriedade de formar uma memória de longa duração (PARK *et al.*, 2012). Há um armazenamento de informação temporária que será utilizada para o planejamento de uma ação futura (DUDCHENKO, 2004). Deste modo, evidenciou-se neste estudo que animais lesionados com 6-OHDA, ao serem desafiados no teste *Y-maze*, apresentaram perdas na memória operacional. Em consonância com esse dado, trabalhos demonstram que a 6-OHDA, por aumentar o estresse oxidativo, é capaz de desencadear danos na memória operacional similares aos característicos da DP (HEFCO *et al.*, 2003; PEREZ *et al.*, 2009). Contudo, o exercício previne significativamente estes prejuízos na memória operacional, promovidos pela 6-OHDA. Estudos com animais indicam que o exercício físico é capaz de provocar alterações funcionais e estruturais no cérebro, além de causar um efeito benéfico na função executiva como um todo, em razão do aumento da atividade neuronal em regiões cerebrais responsáveis pela cognição (COTMAN; BERCHTOLD; CHRISTIE, 2007). Assim, o efeito do exercício físico na integridade cognitiva vem sendo analisado em diversos trabalhos ao longo dos últimos anos, devido as suas propriedades neuroprotetoras (LARSON *et al.*, 2006; VAN PRAAG, 2009).

Ainda em relação aos déficits cognitivos, tais como redução da memória de reconhecimento, estudos têm destacado que estes podem preceder o início da DP (BENITO-LEON *et al.*, 2011; DALAKER *et al.*, 2011). Deste modo, foi utilizada uma variedade de modelos animais de DP, incluindo-se a administração da neurotoxina 6-OHDA (UNGERSTEDT, 1968). O teste de reconhecimento de objeto é um paradigma cognitivo que avalia a memória de reconhecimento, sendo amplamente usado para investigar situações experimentais em modelos animais nos quais a cognição é prejudicada (HOPKINS; BUCCI 2010). Nesta pesquisa, evidenciaram-se alterações na memória de reconhecimento no grupo lesionado por 6-OHDA, com relação aos grupos FO. É importante ressaltar que os achados desta pesquisa foram análogos a estudos anteriores, mostrando défices em tarefas de memória (DE LEONIBUS *et al.*, 2009; FERRO *et al.*, 2005). Entretanto, no grupo 6-OHDA com exercício, efeitos importantes foram percebidos na reversão dos déficits cognitivos. Corroborando com esses achados, um estudo, recentemente realizado por Góes *et al.*, (2014), mostrou que lesões induzidas 6-OHDA ocasionam perda na memória de reconhecimento, sendo esta revertida com protocolo de

exercício. Além disso, diferentes estudos têm demonstrado que o exercício físico atenua transtornos cognitivos e comportamentais, assim como anormalidades neurobiológicas em ratos expostos a 6-OHDA (LANDERS *et al.*, 2013; REIJNDERS *et al.*, 2008; TAJIRI *et al.*, 2010; VAI; BOLLETTINI; BENEDETTI, 2014).

Inúmeros são os esforços para identificar as causas da DP, entre estas, estresse oxidativo, inflamação da micróglia, disfunção mitocondrial (CHU *et al.*, 2002) e alterações no metabolismo da glicose, sendo também observado aumento dos níveis de lactato cerebrais (PUCHADES *et al.*, 2013). Os níveis elevados de lactato são geralmente associados com aumento da morbidade e mortalidade em pacientes com doenças crônicas ou graves (BAKKER; LIMA; 2004). Trabalhos anteriores mostraram concentrações de lactato significativamente elevadas em pacientes recém-diagnosticados com DP e em tratamento, quando comparados aos controles (DURAN *et al.*, 2011).

Constatamos que após a lesão por 6-OHDA, ocorreu um aumento nas concentrações séricas de lactato no grupo 6-OHDA sem exercício em relação ao grupo FO sem exercício, o que foi revertido no grupo 6-OHDA com exercício. Ressalta-se, ainda, o efeito positivo do exercício físico nas concentrações de lactato em plasmas sanguíneo, que se tornaram mais baixas do que os valores observados no grupo sedentário. Em pesquisa desenvolvida com protocolo de exercício em modelo animal, verificou-se que valores de lactato foram menores em grupos treinados, quando comparados aos animais sedentários, confirmando os efeitos melhorados de metabolização do lactato pelo treinamento com exercício físico (TEXEIRA, 2010).

Embora inóvia de maiores averiguações, alguns autores apontam que o exercício físico predominantemente aeróbico, praticado regularmente e com uma intensidade moderada pode promover melhor resposta das defesas antioxidantes do organismo, uma vez que o aumento progressivo da captação de oxigênio pelos tecidos musculares pode promover uma adaptação do organismo ao longo do tempo que, por sua vez, causa uma diminuição das concentrações sanguíneas de lactato (ELOSUA *et al.*, 2003; RAHMAN *et al.*, 2006). Desta forma, o exercício físico progressivo, predominantemente aeróbico, estimula a produção de enzimas que convertem o lactato novamente em piruvato, evitando maiores danos nos sistemas de defesa antioxidante (POWERS; LENNON, 1999; SUREDA *et al.*, 2009).

Sabe-se que a alteração molecular e bioquímica mais característica da DP é, possivelmente, a degeneração da via nigroestriatal, como descrito anteriormente, o que ocasiona a depleção de DA (NEVES, 2014). Tanto estudos bioquímicos quanto os de diagnóstico por imagem sugerem que uma diminuição de pelo menos 70% das concentrações de DA estriatal ocorre antes do início dos sintomas clínicos do parkinsonismo progredindo ao longo do tempo (BROOKS, 1998). Assim medição das monoaminas no CE serve como um importante método para determinar se há existência de efeito terapêutico sobre os neurônios dopaminérgicos. As atividades dos neurônios dopaminérgicos pode, assim, ser inferido através da determinação dos níveis de DA, DOPAC e HVA no cérebro ou no fluido cerebrospinal (MOORE; WEST; DAWSON, 2005).

O presente estudo evidenciou que a injeção unilateral com 6-OHDA no CE causou uma diminuição expressiva nas concentrações de DA, DOPAC e HVA, quando comparadas aos grupos FO. Essas implicações são consistentes com outras pesquisas que descrevem as alterações nas monoaminas em CE lesionado com 6-OHDA (GLAJCH *et al.*, 2012; HEUER; SMITH; DUNNET, 2012; ICHITANI *et al.*, 1994; SHOBANA *et al.*, 2012). No grupo 6-OHDA com exercício, observou-se uma proteção na redução dos níveis estriatais de DA e HVA, não apresentando diferenças nos níveis de DOPAC. Em trabalhos anteriores (AMANDA *et al.*, 2003; TILLERSON *et al.*, 2001), demonstrou-se que o exercício forçado foi capaz reduzir a perda de DA, ocasionada por 6-OHDA. Sugeriu-se, ainda, que o exercício físico contribua para a ativação do sistema dopaminérgico, aumentando a disponibilidade de DA no CE (HATTORI; NAOI, 1994).

Em estudo com aneurotoxina 6-OHDA e aplicação do protocolo de exercício natação por quatro semanas em camudongos, inferiu-se a capacidade que o exercício tem de reduzir a neurotoxicidade, mantendo as concentrações de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) próximos da normalidade. Por conseguinte, o exercício parece agir através de mecanismos que resgatam as células comprometidas no CE de ratos (GOES *et al.*, 2014).

Torna-se importante destacar que o cérebro é considerado altamente sensível ao dano oxidativo, uma vez que possui níveis elevados de fosfolípidios e ácidos graxos poli-insaturados livres, os quais são altamente suscetíveis a oxidantes, além de possuir um elevado consumo de oxigênio e baixos níveis de enzimas antioxidantes (JENNER, 2003).



Neste estudo, a infusão de 6-OHDA produziu dano oxidativo no CE lesionado, que foi confirmado por uma elevação do produto da peroxidação lipídica, o MDA. Outro resultado interessante é que a lesão oxidativa não ficou restrita apenas a esta área cerebral, mas apresentou um efeito deletério no CPF e HC.

Estes danos oxidativos em roedores tratados com 6-OHDA são consistentes com relatos anteriores (AHMAD *et al.*, 2012; SHOBANA; KUMAR; SUMATHI, 2012). A 6-OHDA é uma neurotoxina que pode facilmente sofrer um processo de auto-oxidação produzindo  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$  (OPACKA-JUFFRY; WILSON; BLUNT, 1998). Corroborando com nossos achados, diferentes pesquisas evidenciaram que a 6-OHDA apresenta efeitos oxidativos sobre várias regiões do cérebro, tais como CPF, cerebelo e HC, sendo este último o primeiro a sofrer os efeitos da 6-OHDA na indução deste processo, mesmo antes do surgimento do comprometimento motor decorrente da perda da regulação dopaminérgica na via nigroestriatal (FERRO, 2007; MATSUMOTO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Isso demonstra que a destruição progressiva produzida pela 6-OHDA pode afetar outras áreas cerebrais e não somente aos neurônios da via nigroestriatal.

Deste modo, o exercício físico apresentou um possível efeito neuroprotetor, uma vez que foi capaz de reduzir de forma significativa a peroxidação lipídica no teste de TBARS no CE, CPF e HC. Assim, o exercício físico é conhecido por aumentar os níveis do sistema antioxidante cerebral e regular os níveis dos danos oxidativos (AGUIAR *et al.*, 2010; POWERS; TALBERT; ADHIHETTY, 2011; TUON *et al.*, 2010; VILLANUEVA; KROSS 2012). Entretanto, esta resposta está sujeita ao tipo de exercício realizado, de modo que alta intensidade pode aumentar o dano oxidativo no cérebro, enquanto baixa intensidade promove neuroproteção (AGUIAR *et al.*, 2011; REID, 2001).

No que se refere ao NO, este participa de diversas funções do SNC, incluindo indução e manutenção da plasticidade sináptica, liberação de neurotransmissores e remoção de agentes patogênicos (CHEN *et al.*, 2004). NO é um radical livre que possui um elétron isolado e se liga a diversos compostos que também contêm elétrons isolados. Difunde-se no citosol e membranas lipídicas, assim como para dentro das células. Em elevadas concentrações, pode formar espécies tóxicas e reativas, através de sua combinação com o  $O_2^{\cdot-}$  ou oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; LIEW; WEI; PROUDFOOT, 1997). Em situações patológicas, tais como doenças neurodegenerativas, podemos encontrar uma

grande concentração de NO capaz de causar respostas tóxicas na célula. Portanto, a molécula de NO é extremamente tóxica e danifica proteínas, lipídeos de membrana e DNA. De modo indireto, podemos quantificar a produção do NO através da dosagem de seus metabólitos NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> (GUO *et al.*, 2007).

Neste estudo, foi possível constatar que a infusão da 6-OHDA aumentou os níveis de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> no CED, CPF e HC. Estes dados estão de acordo com trabalho em modelo de 6-OHDA, no qual foi observado aumento dos níveis de NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> (ARAÚJO, 2012; GUO *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2006). Várias pesquisas afirmam que o exercício físico está associado à estimulação da produção de NO (HIGASHI; YOSHIZUMI, 2004; MENEZES, 2012). Contudo, nesta pesquisa, o exercício foi capaz de reduzir, expressivamente, estes níveis nas áreas estudadas.

O GSH é o mais importante componente das defesas antioxidantes celulares (DICKINSON; FORMAN, 2002), também desempenha grandes papéis como anti-inflamatório, antitoxina e regulador metabólico (KIDD, 2000). Os níveis baixos de GSH levam a um aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, morte celular (JHA *et al.*, 2000). É notável que a depleção de GSH contribua para o aparecimento de doenças neurodegenerativas como DP. Por conseguinte, foi encontrado decréscimo nos níveis GSH, em amostras de SNpc de pacientes *post-mortem* com a DP (MAETZLER *et al.*, 2011).

Neste estudo não foi observado um decréscimo nos níveis de GSH induzido pela 6-OHDA no CED, acometendo exclusivamente o CPF. Pesquisa anterior também relata não ter ocorrido diminuição nos níveis de GSH ocasionado pela 6-OHDA, em mesencéfalo e CE de ratos (MENEZES, 2012). Igualmente, o protocolo de exercício não alterou os níveis de GSH no CE, apresentando aumento significativo somente no CPF. Os efeitos antioxidantes do exercício no SNC começaram a ser descritos na última década (LIU *et al.*, 2000; MATTSON, 2000), sendo capaz de alterar o estado antioxidativo e redox do encéfalo (SOMANI *et al.*, 1996), agindo de forma a diminuir o estresse oxidativo e, assim, reduzir a incidência de doenças neurodegenerativas (HOLLOSZY, KOHRT, 1995).

A AChE é encontrada no SNC em regiões como hipotálamo, SN, CE, HC, cerebelo e também no fluido cérebro-espinhal (JIN *et al.*, 1998). Esta enzima é secretada nas terminações nervosas, sendo esta taxa de secreção modulada pela estimulação neuronal, pelo nível de neurotransmissor na fenda sináptica, bem como pelo tratamento com drogas (RANG *et al.*, 2007). É uma enzima regulatória,

responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses por meio da hidrólise do neurotransmissor ACh, sendo esta uma função chave na regulação da transmissão dos impulsos nervosos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; PATOČKA *et al.*, 2005). ACh é sintetizada e armazenada em vesículas no neurônio pré-sináptico, em que a liberação depende de alterações iônicas e elétricas da membrana plasmática (MOTA *et al.*, 2012).

Por ser uma enzima fundamental ao sistema nervoso, está relacionada às doenças como Doença de Alzheimer e DP, dentre outras doenças degenerativas (GIACOBINI, 2004). Assim, devido à função chave da AChE, torna-se um dos alvos moleculares mais vulneráveis a agentes neurotóxicos, pesticidas, venenos e também a fármacos voltados para o tratamento de DP (GONÇALVES, 2009; QUINN, 1987). No presente trabalho, a lesão por 6-OHDA ocasionou uma redução da atividade de AChE no CPF, HC e CE, quando comparado ao FO sem exercício, porém esta diminuição da atividade da AChE se intensificou nos grupos que realizaram exercício. Trabalho realizado com escopolamina causando diminuição das capacidades de aprendizagem e função de memória, evidenciou que o exercício em esteira suprimiu a expressão AChE no HC (YU-MIO *et al.*, 2014). Os resultados sugerem que a supressão da AChE, ocasionado pelo exercício em esteira, pode ser de valor terapêutico em doenças neurodegenerativas.

O BDNF desempenha várias funções na regulação da diferenciação, sobrevivência e na plasticidade de diversas populações distintas de neurônios (BAYDYUK; XU, 2014; CHENG *et al.*, 2003), demonstrando extrema importância para o desenvolvimento normal do cérebro. Os resultados dos níveis de BDNF, em animais expostos à injeção 6-OHDA, se mostraram mais baixos. Em contrapartida, quando expostos ao exercício, estes apresentaram melhores do que os observados nos grupos controle (sedentários). Existe uma consistente literatura indicando que os protocolos de treinamento, envolvendo exercícios de leve e moderada intensidade, regulam a expressão e os níveis de neuroproteínas, como o BDNF, em diferentes áreas do cérebro de roedores, tais como o HC (BERCHTOLD *et al.*, 2005; PLOUGHMAN *et al.*, 2007; AGUIAR *et al.*, 2011) e CE (AGUIAR *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2009; ENGESSER-CESAR; ANDERSON; COTMAN, 2007).

Estudos evidenciaram que ratos exercitados em esteira, após a lesão por 6-OHDA, exibiram aumento dos níveis de BDNF e também GDNF bilateralmente no CE, quando comparados aos animais sedentários (PLOUGHMAN *et al.*, 2007; TAJIRI

*et al.*, 2010). Fatores neurotróficos como o GDNF e o BDNF são amplamente reconhecidos como os mecanismos endógenos pelos quais o exercício físico age sobre a neuroproteção do SNC (COTMAN; BERCHTOLD, 2002; HENNIGAN; O'CALLAGHAN; KELLY, 2007). A expressão de ambos os fatores, GDNF e BDNF, se encontra expressivamente reduzida em pacientes portadores da DP, inferindo-se que a neurodegeneração observada na DP é parcialmente devida à plasticidade neural negativa, agregada ao decréscimo do conteúdo de fatores neurotróficos (HOWELLS *et al.*, 2000; CHAUHAN; SIEGEL; LEE, 2001). Em modelos experimentais, a recuperação neuronal, após a administração de 6-OHDA, é aparentemente relacionada ao acréscimo dos níveis estriatais de GDNF e BDNF (COHEN *et al.*, 2003).

Foi observado que, após a exposição às toxinas tais como MTPT em modelos experimentais, os níveis de BDNF e outras neurotrofinas também se encontraram reduzidos no CE (TRIPANICKUL; GERDPRASERT; JAROENSUPPAPERCH, 2010) e no HC (LESEMANN *et al.*, 2012). Entretanto, o exercício leva à regulação positiva dos fatores neurotróficos em regiões do SNC, que adequam a sobrevivência neuronal, diferenciação e plasticidade sináptica (AGUIAR *et al.*, 2011; TUON *et al.*, 2012).

Molteni *et al.*, (2002), estudando a neuroproteção desencadeada por exercícios físicos realizados por ratos após injúria tecidual, demonstraram que o aumento da expressão de fatores neurotróficos como BDNF, após a prática de exercício físico, altera a plasticidade neuronal, atuando nas terminações pré e pós-sinápticas. Portanto, a expressão de BDNF está diminuída em modelos animais da DP (LAU *et al.*, 2011; TAJIRI *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2011) e em cérebros de pacientes parkinsonianos *post-mortem* (HOWELLS *et al.*, 2000). Por outro lado, o exercício físico é capaz de recuperar os níveis de BDNF, tanto em modelos animais (COSTA *et al.*, 2012; SMITH, ZIGMOND, 2003; WU *et al.*, 2011) quanto em pacientes com a DP (AHLKOG, 2011).

Estes resultados podem ajudar na compreensão dos efeitos preventivos do exercício físico sobre o nível de TH, pois, de acordo com Fukuchi e colaboradores (2010), a transcrição do gene TH é positivamente ajustada pelo BDNF. Os mecanismos responsáveis pela perda de células dopaminérgicas nigroestriatais ainda permanecem obscuros (ABOU-SLEIMAN; MUQIT; WOOD, 2006; SRIVASTAVA *et al.*, 2012). No entanto, sabe-se pontualmente que os

marcadores neuroquímicos específicos para a doença incluem densa redução de DA, bem como os níveis de TH (HEIKKILA; SONSALLA, 1992). A TH é a primeira enzima atuante na síntese de DA, sendo enzima limitante da velocidade de síntese de DA e estando presente nos neurônios dopaminérgicos na área nigroestriatal (RIBEIRO *et al.*, 2013). A síntese de DA consiste na conversão do aminoácido tirosina em L-Dopa pela ação da enzima TH, assim DP pode ser considerada como uma síndrome de deficiência de TH no CE (ROUSSEAU *et al.*, 2012; ZHU; ZHANG; ZENG, 2012).

Os nossos resultados mostram que injeção intraestriatal de 6-OHDA causou decréscimos nos níveis de TH e que o treinamento físico protegeu contra as implicações da neurotoxina. Tajiri e colaboradores (2010) também usaram o treinamento em esteira e corrida durante 30 minutos, uma vez por dia, durante 4 semanas, o que mostrou preservação significativa de TH no CE e em neurônios da SNpc. Vários modelos animais de DP, que utilizaram o exercício físico como tratamento, revelaram efeitos benéficos para TH, embora os parâmetros utilizados como tempo e intensidade dos treinamentos apresentassem diferenças (CHO *et al.*, 2013; COHEN *et al.*, 2003; TAJIRI *et al.*, 2010; TILLERSON *et al.*, 2001; TILLERSON *et al.*, 2003).

Entende-se que os sintomas da DP são ocasionados não unicamente por perdas significativas de dopamina, mas também pelo transportador de DA (DAT), nos gânglios da base. A dopamina é liberada na fenda sináptica por exocitose ou por ação reversa de seu transportador DAT. O transportador de dopamina (DAT) é uma proteína da membrana plasmática, expressa exclusivamente em neurônios dopaminérgicos, que atua sequestrando a dopamina liberada na membrana sináptica, regulando de tal modo a amplitude e a duração da sinalização da dopamina (BANNON, 2005). Na DP, neurônios dopaminérgicos viáveis expressam o transportador de dopamina (DAT) e liberam DA (MADRAS *et al.*, 2006). Na DP existe uma redução na densidade do DAT devido à perda dos terminais dopaminérgicos (STORCH *et al.*, 2004). Assim pesquisas despontam que, na DP, níveis de DAT aumentados estão diametralmente associados com o decréscimo no *turnover* e nas concentrações sinápticas da DA (SOSSI *et al.*, 2007). Tais dados indicam que um papel funcional importante da DAT é manter as concentrações sinápticas de DA relativamente constante e preservar este neurotransmissor nos terminais nervosos. Na presente pesquisa, foi demonstrado que a 6-OHDA

promoveu uma diminuição na imunorreatividade para o DAT, no corpo estriado. Diversos trabalhos apresentam diminuição da expressão e na imunorreatividade do DAT na SN e corpo estriado em animais que sofreram injúrias nigroestriatal com 6-OHDA, quanto com o MPTP (YOKOYAMA *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2009; AFONSO-ORAMAS *et al.*, 2010). Mostramos que a imunomarcção para DAT foi mais intenso no grupo 6-OHDA submetido ao protocolo de exercício. Assim, os efeitos do exercício sobre esses dois biomarcadores da DP ratificam que o mesmo pode ser útil para o tratamento da DP. Petzinger *et al.*, (2007) relatou que exercício intenso em esteira demonstrou, em camundongos submetidos ao modelo com MPTP, aumento na liberação de DA e melhora da performance motora. Possivelmente, estas melhoras se devem ao aumento nos níveis de TH e do DAT.

De fato, o exercício físico se mostrou capaz de reduzir as lesões associadas à injeção intracerebral de 6-OHDA, apresentando, portanto, efeito neuroprotetor contra sinais/sintomas característicos da DP. Logo, nossos os resultados exaltam o exercício como forte candidato no que se refere à terapia coadjuvante da doença.

Quadro 3 – Representação esquemática dos efeitos do protocolo de exercício físico esteira em alterações comportamentais de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

	Apomorfina	Rota Rod	Campo Aberto			Y-Maze	Reconhecimento de Objeto
			Nº Cruzamentos	Nº <i>Rearings</i>	Nº <i>Grooming</i>		
FO C/E <sup>*</sup>							
6-OHDA S/E <sup>*</sup>							
6-OHDA C/E <sup>#</sup>							

Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos comparados com FO sem exercício (S/E) (\*) ou 6-OHDA sem exercício (S/E) (#). Déficit ou diminuição (); melhora ou aumento (); ausência de efeitos estatisticamente significativos ().

Quadro 4 – Representação esquemática dos efeitos do protocolo de exercício físico esteira em testes de monoamina e metabólitos de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

	Monoamina e Metabólitos					
	DA		DOPAC		HVA	
	CED	CEE	CED	CEE	CED	CEE
FO C/E*	↔	↔	↔	↔	↔	↔
6-OHDA S/E*	↓	↓	↓	↓	↓	↓
6-OHDA C/E#	↑	↑	↔	↑	↔	↑

Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos comparados com FO sem exercício (S/E) (\*) ou 6-OHDA sem exercício (S/E) (#). Déficit ou diminuição (↓); melhora ou aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significativos (↔).





















Quadro 5 – Representação esquemática dos efeitos do protocolo de exercício físico esteira em testes TBARS, NITRITO, GSH e AChE de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

Grupos	TBARS				NITRITO				GSH				AChE			
	CPF	HC	CED	CEE	CPF	HC	CED	CEE	CPF	HC	CED	CEE	CPF	HC	CED	CEE
FO C/E*	↔	↔	↔	↓	↔	↓	↔	↔	↔	↓	↔	↔	↑	↓	↓	↓
6-OHDA S/E*	↑	↑	↑	↔	↑	↑	↑	↔	↓	↓	↔	↔	↓	↓	↓	↓
6-OHDA C/E#	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↔	↔	↑	↓	↓	↓







Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos comparados com FO sem exercício (S/E) (\*) ou 6-OHDA sem exercício (S/E) (#). Déficit ou diminuição (↓); melhora ou aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significativos (↔).




Quadro 6 – Representação esquemática dos efeitos do protocolo de exercício físico esteira em testes de lactato e BDNF de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

Grupos	Lactato		BDNF		
	Plasma Sanguíneo	CPF	HC	CED	CEE
FO C/E*					
6-OHDA S/E*					
6-OHDA C/E#					

Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos comparados com FO sem exercício (S/E) (\*) ou 6-OHDA sem exercício (S/E) (#). Déficit ou diminuição (); melhora ou aumento (); ausência de efeitos estatisticamente significativos ().

Quadro 7 – Representação esquemática dos efeitos do protocolo de exercício físico esteira em imunomarcção de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

Grupos	TH	DAT
	CED	CED
FO C/E*		
6-OHDA S/E*		
6-OHDA C/E#		

Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos comparados com FO sem exercício (S/E) (\*) ou 6-OHDA sem exercício (S/E) (#). Déficit ou diminuição (); melhora ou aumento (); ausência de efeitos estatisticamente significativos ().

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o protocolo de exercício físico esteira, com intensidade moderada, foi eficaz no abrandamento das desordens resultantes da exposição de animais a lesão estriatal unilateral por 6-OHDA:

- Antagonizar as alterações comportamentais e cognitivas;
- Reduzir as concentrações de lactato;
- Reverter a diminuição das concentrações estriatais de DA, DOPAC e HVA;
- Reverter o aumento do estresse oxidativo;
- Aumentar AChE em CPF e reduzir em HC e CE;
- Aumentar os níveis de BDNF;
- Proteger contra a diminuição nas imunomarcações para TH e DAT observadas no CED do animal lesionado.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os nossos resultados sugerem que o exercício físico apresenta um efeito neuroprotetor nas alterações comportamentais, neuroquímicas e imuno-histoquímicas na DP, podendo ser potencialmente útil para tratamento desta patologia. Deste modo é possível novas perspectivas no aspecto clínico no que refere-se a associação do exercício físico com o tratamento farmacológico.

## REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D.; *et al.* Depression in Parkinson disease-- epidemiology, mechanisms and management. **Nat Rev Neurol**, 8(1):35-47, 2012.
- ABOU-SLEIMAN, P. M. ; MUQIT, M. M. K.; WOOD, N. W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Nature Reviews – Neuroscience**, 7:207-219, 2006.
- ACSM, Diretrizes da ACSM (AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE) para os testes de esforço e sua prescrição. 6ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2003.
- AGUIAR, A. S., PINHO, R. A. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. **Ver Bras Med Esporte**, 13:355-360, 2007.
- AGUIAR, A. S. JR. *et al.* The exercise redox paradigm in the Down's syndrome: improvements in motor function and increases in blood oxidative status in young adults. **J Neural Transm**, 115(12):1643-50, 2008.
- AGUIAR, A. S. JR. *et al.* Intense Exercise Induces Mitochondrial Dysfunction in Mice Brain. **Neurochem Res**, 33:51-8, 2008.
- AGUIAR, A. S. *et al.* Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain research bulletin**, 79(6): 452–7, 2009.
- AGUIAR, L.M. **Antagonismo do receptor da adenosina A2a: uma nova perspectiva para o tratamento da Doença de Parkinson**. Tese (Doutorado em farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009. 215p.
- AGUIAR, A. S. *et al.* High intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice. Involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. **Neuroscience**, 29:1216–27, 2010.

AGUIAR, A. S. *et al.* Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. **Mech Ageing Dev**, 132:560-7, 2011.

AGUIAR JUNIOR, A.S. **O exercício físico como agente modificador da doença de Parkinson e das discenesias induzidas por L-DOPA: evidencia obtida em modelos experimentais.** Tese (Doutorado em Farmacologia). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. UFSC, tese doutorado – Florianópolis, SC, 2011.p. 139.

AHLSKOG, J. E. Does vigorous exercise have a neuroprotective effect in Parkinson disease? **Neurology**, 77(3):288-94, 2011.

AHMAD, S. *et al.* Neuroprotective effect of sesame seed oil in 6-hydroxydopamine induced neurotoxicity in mice model: cellular, biochemical and neurochemical evidence. **Neurochem Res**, 37:516-26, 2012.

ALBUQUERQUE, E. X.; *et al.* Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, 103(35):13220-13225, 2006.

ALLES, G.A.; HAWES, R.C. Cholinesterase in the blood of man. **J Biol Chem**, 133:375-390, 1953.

AL-JARRAH, M. *et al.* Endurance exercise training promotes angiogenesis in the brain of chronic/ progressive mouse model of Parkinson's Disease. **NeuroRehabilitation**, 26(4):369-73, 2010.

ALFAVARO, T. M. *et al.* Effect of free radicals on adenosine A (2A) and dopamine D2 receptors in the striatum of young adult and aged rats. **Neurochem Int**, 45:733–738, 2004.

ALONSO-FRECH, F.; SANAHUJA, J. J.; RODRIGUEZ, A. M. Exercise and physical therapy in early management of Parkinson disease. **Neurologist**, (6 Suppl 1):S47-53, 2011.

ANDRADE, L. A. D. *et al.* **Doença de Parkinson: estratégias atuais de tratamento**. 1. ed. São Paulo, Seguimento Farma, 308. p. 2010.

ANDRADE, L. A. D. *et al.* **Doença de Parkinson: estratégias atuais de tratamento**. 2. ed. São Paulo, Seguimento Farma, 208. p. 2006.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **AnimBehav**, 21(2):205-235, 1973.

ARCHER, T. ; FREDRIKSSON, A. Physical exercise attenuates MPTP-induced deficits in mice. **Neurotox Res**, 18(3-4):313-27, 2010.

ARIDA, R. M. *et al.* Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents. **Am J Phys Med Rehabil**, 90(6):452-65, 2011.

ARIDA, R. M. *et al.* Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. **Epilepsy Res**, 37(1):45-52, 1999.

ARAÚJO, D. P. **Atividade antioxidante e neuroprotetora do ácido alfa lipóico: uma nova perspectiva para o tratamento da doença de Parkinson**. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012. p. 79.

BEAL, M. F. Experimental models of parkinson's disease. **Nature**, 2:325-332, 2001.

BAKKER, J.; DE LIMA, A. P. Increased blood lactate levels: an important warning signal in surgical practice. **Crit Care**, 8:96-8, 2004.



BARBIERO, J. K. *et al.* 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, 2011.

BARROSO, S. S. **Efeitos comportamentais do exercício e do extrato de própolis vermelha sobre a degeneração de neurônios dopaminérgicos em ratos.**

Dissertação de Mestrado (Saúde e Ambiente). Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, UNIT, 2012.

BAYDYUK, M.; XU, B. BDNF signaling and survival of striatal neurons. **Frontiers in cellular neuroscience**, 8:254, 2014.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso.** 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2002.

BENEDETTI, M. G. *et al.* Treadmill exercise in early multiple sclerosis: a case series study. **Eur J Phys Rehabil Med**, 45(1):53-59, 2009.

BENITO-LEON, J.; *et al.* Population-based case-control study of cognitive function in early Parkinson's disease (NEDICES). **J Neurol Sci**, 310(1–2): 176–82, 2011.

BERCHTOLD, N. C.; CHINN, G.; CHOU, M.; KESSLAK, J. P.; COTMAN, C. W. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. **Neuroscience**, 133:853- 61, 2005.

BETARBET, R. ; SHERER, T.B.; DI MONTE, D.A.; GREENAMYRE, J.T. Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. **Brain Pathol**, 12(4): 499-510, 2002.

BIANCHI, G.P.; GROSSI, G.; BARGOSSO, A.M. May peripheral and central fatigue be correlated? Can we monitor them by means of clinical laboratory tools?. **Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**. 37: 194-199, 1997.

BOBINSKI, F. *et al.* Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, 194:337- 48, 2011.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 2, p. 124-129, 2008.

BROOKS, D. J. The early diagnosis of Parkinson's disease. **Annals of Neurology, Boston**, v. 44, suppl. 1, p. S10-S18, 1998.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 211:51-76, 2012.

BOWEN, B.; CARMER, D. M. E. The effect of a standard exercise upon the oxygen consumption of normal, overweight, and chronically ill individuals. **J Clin Invest**, 2(4):299-313, 1926.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72:248-254, 1976.

BRAAK, H. *et al.* Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res**, 318:121–134, 2004.

BRAGA, A. R. **Indução da morte de neurônios dopaminérgicos por mptp como modelo animal da doença de parkinson: uma abordagem molecular e farmacológica.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacologia). Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.p.132.

BRANDT, M. *et al.* Decision-making impairments in patients with Parkinson's disease. **Behav Neurol**, 15: 77-85, 2004.

BREESE, G. R.; TRAYLOR, T. D. Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. **Br J Pharmacol**, 42(1):88-99, 1971.

BROWN, B. S.; VAN HUSS, W. Exercise and rat brain catecholamines. **J Appl Physiol**, 34:665-9, 1973.

BROWN, A. *et al.* High frequency stimulation of the subthalamic nucleus acutely rescues motor deficits and neocortical movement representations following 6-hydroxydopamine administration in rats. **Exp Neurol**, 231:82-90, 2011.

BROWN, B. S. *et al.* Chronic response of rat brain norepinephrine and serotonin levels to endurance training. **J Appl Physiol**, 46:19-23, 1979.

BRUM, P. C. *et al.* Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Rev. Paul. Educ. Fís.**, São Paulo, 18:21-31, 2004.

BUTTERFIELD, D. A.; BADER LANGE, M.L.; SULTANA, R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1801:924–929, 2010.

CARVEY, P. M.; PUNATI, A.; NEWMAN, M. B. Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. **Cell Transplant**, 15:239-50, 2006.

CASSILHAS, R. C. *et al.* Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. **Neuroscience**, 202:309-17, 2012.

COHEN, A.D. *et al.* Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. **J Neurochem**, 85:299-305, 2003.

- COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, 25:295-301, 2002.
- COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N. C.; CHRISTIE, L. Exercise builds brain health: An interplay of central and peripheral factors. **Trends Neurosci**, 30:464-72, 2007.
- COSTA, M. S. *et al.* The impact of the frequency of moderate exercise on memory and brain-derived neurotrophic factor signaling in young adult and middle-aged rats. **Neuroscience**, 11:100-109, 2012.
- CHAO, O. Y. *et al.* Intranasally applied L-DOPA alleviates parkinsonian symptoms in rats with unilateral nigro-striatal 6-OHDA lesions. **Brain research bulletin**, 87(2 3):340–5, 2012.
- CHANG, H. C. *et al.* Effects of treadmill training on motor performance and extracellular glutamate level in striatum in rats with or without transient middle cerebral artery occlusion. **Behav Brain Res**, 205:450-5, 2009.
- CHAUHAN, N. B.; SIEGEL, G. J.; LEE, J. M. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. **J ChemNeuroanat**, 21:277–288, 2001.
- CHENG, A. *et al.* Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. **Developmental Biology**, 258(2):319–333, 2003.
- CHEN, J. F. The adenosine A(2A) receptor as an attractive target for Parkinson's disease treatment. **Drug News Perspect.**, 16:597-604, 2003.
- CHEN, Z. H. *et al.* Resveratrol inhibits TCDD-induced expression of CYP1A1 and CYP1B1 and catechol estrogen-mediated oxidative DNA damage in cultured human mammary epithelial cells. **Carcinogenesis**, 25:2005-2013, 2004.

CHEN, H. *et al.* Physical activity and the risk of Parkinson disease. **Neurology**, 64:664–9, 2005.

CHO, HAN-SAM. *et al.* Treadmill exercise alleviates short-term memory impairment in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Journal of exercise rehabilitation**, 354-361, 2013.

CHOI, W. S. *et al.* Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP<sup>+</sup>- induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. **Journal of Neuroscience Research**, New York, 57(1):86-94, 1999.

CHU, X. P. *et al.* Proton-gated channels in PC12 cells. **J Neurophysiol**, 87(5): 2555–61, 2002.

DA CUNHA, C. *et al.* Pretraining to find a hidden platform in the Morris water maze can compensate for a deficit to find a cued platform in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, 87(4): 451-63, 2007.

DA CUNHA, C. *et al.* Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. **Behav Brain Res**, 199: 157-70, 2009.

DALAKER, T. O. *et al.* Ventricular enlargement and mild cognitive impairment in early Parkinson's disease. **Mov Disord**, 26 (2):297–301, 2011.

DALL'IGNA, O. P. *et al.* Caffeine and adenosine A<sub>2a</sub> receptor antagonists prevent beta-amyloid (25-35) -induced cognitive deficits in mice. **Exp Neurol**, 203:241–245, 2007.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. **Pharmacology**, 22: 113-127, 1981.

DAVIE. P.S.; WELLS, R.M.G.; TETENS, V. Effects of sustained swimming on rainbow trout musculature structure, blood oxygen transport, and lactate

dehydrogenase isozymes: evidence for increased aerobic capacity of white muscle. **J.exp. Zool.**, 237, 159-171. 1986).

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, 39:889-909, 2003.

DAVIES, C. T. M. AND THOMPSON, M. W. (1986). Physiological responses to prolonged exercise in ultramarathon athletes. /. **appl. Physiol.** 61, 611-617.

DECRESSAC, M.; MATTSSON, B.; BJÖRKLUND, A. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and  $\alpha$ -synuclein ratmodels of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, 235(1):306-15, 2012.

DELEU, D.; NORTHWAY, M.G.; HANSSENS, Y. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs used in the treatment of Parkinson's disease. **Clinical Pharmacokinetic**, 41:261-309, 2002.

DE LEONIBUS, E. *et al.* Metabotropic glutamate receptors 5 blockade reverses spatial memory deficits in a mouse model of Parkinson's disease. **Neuropsychopharmacology** . 34, 729-738, 2009.

DESCARRIES, L; GISIGER, V; STERIADE, M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. **Prog Neurobiol.** 1997;53(5):603-25.

DICKINSON, D.A.; FORMAN, H.J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochem Pharm**, 64:1019–1026, 2002.

DIETRICH, E. Bevegelsesforstyrrelser of basal ganglienes funksjon. **Tidsskr NorLegeforen**, 128(17):1968–71, 2008.

DING, Q. *et al.* Insulin-like growth factor I interfaces with brain-derived neurotrophic factor-mediated synaptic plasticity to modulate aspects of exercise-induced cognitive function. **Neuroscience**, 140:823-33, 2006.

DING, Y. H. *et al.* Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model. **Neurol Res**, 28(2):184-189, 2006.

DOHM, M. R.; HAYES, J. P.; GARLAND, T. Jr. The quantitative genetics of maximal and basal rates of oxygen consumption in mice. **Genetics**, 159:267-77, 2001.

DORSEY, E.R. *et al.* Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, 68:384-386, 2007.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 186:421-431, 1990.

DUDCHENKO, P. A. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 28:699-709. 2004.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc**, 46(3):208-9, 1957.

DURAN, R. *et al.* Oxidative stress and aminopeptidases in Parkinson's disease patients with and without treatment. **Neurodegener Dis**, 8 (3):109-16, 2011.

DUTRA, M. F. **Efeitos do exercício físico sobre a expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e comportamento motor de ratos submetidos ao modelo de doença Parkinson induzida por 6-OHDA.** f 98. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas neurociências). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

ELDEEN, IM; ELGORASH, I EE; VAN STADEN, J. Antibacterial, anti-inflammatory, anticholinesterase and mutagenic effects of extracts obtained from some trees used in South African traditional medicine. **J Ethnopharmacol.** 2005 Dec 1;102(3):457-64.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, 7:88-95, 1961.

ELOSUA, R. *et al.* Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. **Atherosclerosis**, 167:327-34, 2003.

ENGESSER-CESAR, C.; ANDERSON, A. J.; COTMAN, C. W. Wheel running and fluoxetine antidepressant treatment have differential effects in the hippocampus and the spinal cord. **Neuroscience**, 144:1033-44, 2007.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behav Brain Res**, 31(1):47-59, 1988.

FABBRINI, G. *et al.* Fatigue in Parkinson's disease: Motor or non-motor symptom? **Parkinsonism Relat Disord**, 19(2):148-52, 2013.

FERNANDEZ, H. H. Updates in the medical management of Parkinson disease. **ClevelandClinic Journal of Medicine**, 79:28-35, 2012.

FERRO, M.M. **Caracterização neuroquímica e comportamental da lesão da via nigroestriatal com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (mptp) e 6-hidroxiDA (6-ohda) em ratos.** Tese (Doutorado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, 2007.

FERRO, M. *et al.* Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: Histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of Neuroscience Methods**, 148:78-87, 2005.

FORNAGUERA, J.; SCHWARTING, R. K. Early behavioral changes after nigro-striatal system damage can serve as predictors of striatal dopamine depletion. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, 8:1353-1368, 1999.

FOSTER, P.P.; ROSENBLATT, K.P.; KULJIŠ, O. Exercise-induced cognitive plasticity, implications for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. **FrontNeur**, 2:28,1-15, 2011.



FUKUCHI, M. *et al.* Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca (2+) signals evoked via the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. **Brain Res**, 1366:18–26, 2010.

FRIEDMAN, J. H. Fatigue in Parkinson's disease patients. **Curr Treat Options Neurol**, 11(3):186-90, 2009.

FREDRIKSSON, A. *et al.* Running wheel activity restores MPTP-induced functional deficits. **J Neural Transm**, 118(3): 407-20, 2011.

GARCIA, P. C. **Expressão de proteínas sinápticas e Estruturais no sistema nervoso de ratos Submetidos a diferentes modalidades de Exercício físico.** Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Mestrado em Fisioterapia da Universidade Cidade de São Paulo, 2012, 100p.

GEORGIEVSKA, B. *et al.* Neuroprotection in the rat Parkinson model by intrastriatal GDNF gene transfer using a lentiviral vector. **Neuro Report**, 13:75-82, 2002.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission**, 103:987-1041, 1996.

GILADI, N. *et al.* Risk factors for dementia, depression and psychosis in long-standing Parkinson's disease. **J Neural Transm**, 107(1):59-71, 2000.

GLAJCH, K.E.; FLEMING, S.M.; SURMEIER, D.J.; OSTEN, P. Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res**, 230:309-16, 2012.

GOMES, AM; KOSZUOSKI, R. Evidências atuais do impacto terapêutico dos inibidores da acetilcolinesterase no transtorno cognitivo leve e na demência vascular. **Rev Psiquiatr RS**. 2005; 27 (2):197-205.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, 126:131-138, 1982.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors: new roles and therapeutic alternatives. **Pharmacological Research**, London, 50:433-440, 2004.

GOBBI, L. T.; BUCKEN, F. A.; VITÓRIO, R. **Doença de Parkinson e exercício físico**. Curitiba: Editora CRV, 2014.

GOES, A. T. *et al.* Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, 256:61-71, 2014.

GOETZ, C. G. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 1:1-15, 2011.

GOMEZ-PINILLA, F. *et al.* Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **J Neurophysiol**, 88:2187-95, 2002.

GUO, S. *et al.* Protective Effects of Green Tea Polyphenols in the 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease Through Inhibition of ROS-NO Pathway. **Biological Psychiatry, New York**, v. 62, n. 12, p. 1353-1362, 2007.

GOMES, E. C.; SILVA, A. N.; OLIVEIRA, M. R. Oxidants, Antioxidants, and the beneficial roles of exercise-induced production of reactive species. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 12, 2012.

GUERRERO, E. *et al.* Recent advances in  $\alpha$ -synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. **Molecular Neurobiology**, 47:525-536, 2013.

GUO, S. *et al.* Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. **Biol Psychiatry**, 62(12):1353-62, 2007.

HALBACH, O.B.; SCHOBER, A.; KRIEGLSTEIN, K. Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, 73:151-177, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 31:1454, 1999. 130

HATTORI, S.; NAOI, M.; NISHINO, H. Striatal dopamine turnover during treadmill running in the rat: relation to the speed of running. **Brain Research Bulletin**, 35(1):41-49, 1994.

HAUSER, R.; ZESIEWICZ, T. **A doença de Parkinson: perguntas e respostas**. 3ª ed. São Paulo: Novartis, 2001.

HAVEL, R.J.; NAIMARK, A.; BORCHEGREWINK, C.F. Turnover rate and oxidation of free fatty acids of blood plasma in man during exercise: studies during continuous infusion of palmitate-1-C14. **J Clin Invest**, 42:1054-63, 1963.

HAYES, K. *et al.* Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. **Acta Neuropathol**, 115:289-96, 2008.

HAWKES, C. H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. A timeline for Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, 16:79-84, 2010.

HEFCO, V. *et al.* Role of the mesotelencephalic dopamine system in learning and memory processes in the rat. **European Journal of Pharmacology**, 475:55-60, 2003.

HEIKKILA, R. E.; SONSALLA, P. K. The MPTP-treated mouse as a model of Parkinsonism: How good is it? **Neurochemistry International**, 20:299-303, 1992.

HEUER, A.; SMITH, G.A.; DUNNETT, S.B. Comparison of 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra and the medial forebrain bundle on a lateralised choice reaction time task in mice. **Eur J Neurosci**, 2012.

HENNIGAN, A.; O'CALLAGHAN, R. M.; KELLY, A. M. Neurotrophins and their receptors: roles in plasticity, neurodegeneration and neuroprotection. **Biochem Soc Trans**, 35(2):424-7, 2007.

HIGASHI, Y.; YOSHIZUMI, M. Exercise and endothelial function: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacol Ther**, 102(1):87-96, 2004.

HILLMAN, C. H.; ERICKSON, K. I.; KRAMER, A. F. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. **Nat Rev Neurosci**, 9(1): 58-65, 2008.

HIRSCH, M. A.; FARLEY, B. G. Exercício e neuroplasticidade em pessoas que vivem com a doença de Parkinson. **European Journal of Physical Rehabilitation Medicine**, 45:215-29, 2009.

HIRSCH, M. A.; FARLEY, B. G. Exercise and neuroplasticity in persons living with Parkinson's disease. **Eur J Phys Rehabil Med**, 45(2):215-29, 2009.

HOLLOWAY, R. G. *et al.* Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial. **Archives of Neurology**, 61:1044–1053, 2004.

HOPPELER, H. *et al.* Muscle structure with low- and high-fat diets in welltrained male runners. **Int J Sports Med**, 20:522–526, 1999.

HOLLOSZY, J. O.; KOHRT, W. M. Exercise. In: Masoro EJ, editor. Handbook of physiology. Aging. **New York**: Oxford Press; 1995. p. 633–66.

HOPKINS, M.E.; BUCCI, D.J. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-induced improvement in object recognition memory. **Neurobiol learn mem**, 94:278-284, 2010.

HOSAMANI, R.; KRISHNA, G.; MURALIDHARA. Standardized *Bacopamonnieri* extract ameliorates acute paraquat-induced oxidative stress, and neurotoxicity in prepubertal mice brain. **Nutritional Neuroscience**, 1:1-13, 2014.

HOHLEFELD, F. U. *et al.* Correlation between cortical and subcortical neural dynamics on multiple time scales in Parkinson's disease. **Neuroscience**, 298:145-60, 2015.

HOWELLS, D. W. *et al.* Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. **Exp Neurol**, 166(1):127-35, 2000.

ICHITANI, Y. *et al.* Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in the substantia nigra. **Exp Neurol**, 130:269–278, 1994.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 79:368-376, 2008.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, 3:26-36, 2003.

JENNER, P. **In Principles of Treatment in Parkinson's Disease**. Philadelphia: Elsevier, 2005.

JIANG, C. *et al.* Dopaminergic properties and experimental anti-parkinsonian effects of IPX750 in rodent models of Parkinson disease. **Clin Neuropharmacol**, 27(2): 63-73, 2004.

JHA, N. *et al.* Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity: implications for Parkinson's disease. **J Biol Chem**, 275:26096–27001, 2000.

JIN, B. *et al.* Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal  $\alpha$ -amylase by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, 66:201-6, 1998.

JIN, F. *et al.* Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. **European Journal of Pharmacology**, 600:78–82, 2008.

JIANG, C-S. *et al.* Local built-in potential on grain boundary of Cu(In,Ga) Se<sub>2</sub> thin films. **Appl Phys Lett**, 84:3477–3479, 2004.

JOHN R. *et al.* Candy, and Robert H. Perry. Molecular Forms of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Aged Human Central Nervous System. **J Neurochem**. 47, 263-277 (1986).

KABUTO, H.; YAMANUSHI, T.T. Effects of Zingerone [4-(4-Hydroxy-3-Methoxyphenyl)-2-Butanone] and Eugenol [2-Methoxy-4-(2-Propenyl)Phenol] on the Pathological Progress in the 6-Hydroxydopamine-Induced Parkinson's Disease Mouse Model. **Neurochem Res**, 36:2244–49, 2011.

KAHLE, P.J. *et al.* Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related disease. **Journal of Neurochemistry**, 82:449-457, 2002.

KALINDERI, K. *et al.* GSK3b polymorphisms, MAPT H1 haplotype and Parkinson's disease in a Greek cohort. **Neurobiol Aging**, 32:546.e1–546.e5., 2011.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Princípios de Neurociência**. São Paulo: Manole, 2003.

KASTEN. *et al.* Depression and Quality of Life in Monogenic Compared to Idiopathic, Early-Onset Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v.000, n. 000. 2012.

KEMPERMANN, G.; KUHN, H. G.; GAGE, F. H. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. **Nature**, 386:493-5, 1997.

KEMI, O. J. *et al.* Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and muscle hypertrophy. **J Appl Physiol**, 93:1301-9, 2002.

KIDD, P. M. Parkinson's disease as a multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. **Altern Med Rev**, 5:502-545, 2000.

KIM, Y.S. *et al.* Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport**, 13(9):2387-2390, 1998.

KIM, S. E. *et al.* Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. **Exp Gerontol**, 45 (5): 357-65, 2010.

KIRIK, D.; GEORGIEVSKA, B.; BJORKLUND, A. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. **Nat Neurosci**, 7(2):105-10, 2004.

KOHL, Z. *et al.* Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. **Brain Res**, 1155:24-33, 2007.

KOO, H-J.; LEE, H-J.; IM, H. Sequence determinants regulating fibrillation of human  $\alpha$ -synuclein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 368: 772-778, 2008.

LABANDEIRA-GARCIA, J. L. *et al.* Time course of striatal changes induced by 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway, as studied by combined evaluation of rotational behaviour and striatal Fos expression. **Exp Brain Res**, 108:69-84, 1996.

LARSON, E. B. *et al.* Exercise is associated with reduced risk for incident dementia among persons 65 years of age and older. **Annals of Internal Medicine**, 144:73-81, 2006.

LANDERS, M. R. *et al.* Comparison of voluntary and forced exercise in protecting against behavioral asymmetry in a juvenile hemiparkinsonian rat model. **Behav Brain Res**, 248:121-8, 2013.

LANG, A.E.; LOZANO, A.M. Parkinson's disease.Part 1. **N Engl J Med**, 339:1044-1053, 1998.

LAU, Y.-S. *et al.* 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, 2011.

LAURIN, D. *et al.* Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. **Arch Neurol**, 58(3):498-504, 2001.

LEANDRO, C. G. *et al.* Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, 13(5), 2007.

LESEMANN, A. *et al.* MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depressionlike behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. **Brain Res**,31:1457-51, 2012.

LEWIS, M. H. Environmental complexity and central nervous system development and function.**Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, 2:91-5, 2004.

LEVY, O. A.; MALAGELADA, C.; GREENE, L. A. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. **Apoptosis**, 14:478-500, 2009.

LI, Y.*et al.* Regulates mitochondrial morphology and dynamics through parkin. **Neuroscience**, 199:346-58, 2011.

LIU, H. *et al.* Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. **Behav Brain Res**, 218:308-14, 2011.



LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and Nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 352(1359):1311-5, 1997.

LINDGREN, H. S.; LELOS, M. J.; DUNNETT, S. B. Do  $\alpha$ -synuclein vector injections provide a better model of Parkinson's disease than the classic 6-hydroxydopamine model? **Exp Neurol**, 237(1):36-42, 2012.

LIGHFOOT, J. T. *et al.* Interstrain variation in murine aerobic capacity. **Med Sci Sports Exerc**, 33:2053-7, 2001.

LIU, J. *et al.* Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. **Brain Res**, 886:47-53, 2000.

LOMBARDO, T. A. *et al.* The effect of exercise on coronary blood flow, myocardial oxygen consumption and cardiac efficiency in man. **Circulation**, 7:71-8, 1953.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with follin phenol reagent. **J Biol Chem**, 193:265-275, 1951.

LUCHTMAN, D. W.; SHAO, D.; SONG, C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Physiology & behavior**, 98(1-2):130-8, 2009.

MAETZLER, W. *et al.* Reduced but not oxidized cerebrospinal fluid glutathione levels are lowered in Lewy body diseases. **Mov Disord**, 26(1):176-81, 2011.

MARTINEZ-MARTIN, P.; PRIETO, L.; FORJAZ, M. J. Longitudinal metric properties of disability rating scales for Parkinson's disease. **Value Health**, 9(6):386-93, 2006.

MASSOULIÉ, J. *et al.* Molecular and cellular biology of cholinesterase. **Progr. Neurobiol.**, 41: 31-91, 1993.

MATTSON, M. P. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. **Brain Res**, 886:47-53, 2000.

MATSUMOTO. *et al.* Excessive expression of hippocampal ezrin is induced by intrastriatal injection of 6-OHDA. **Biol Pharm Bull**, 34(11):1753-58, 2011.

MAYO, J. C. *et al.* Melatonin and Parkinson's disease. **Endocrine**, 27:169-178, 2005.

MENEZES, A. P. F. **Efeitos da curcumina e do resveratrol em ratos com parkinsonismo experimental induzido por 6-hidroxidopamina: um estudo comportamental e neuroquímico.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2012. p. 130.

MEREDITH, G. E.; KANG, U. J. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Mov Disord**, 21:1595-1606, 2006.

MESULAM M.M., *et al.* Acetylcholinesteraseknouckouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterasehydrolyse acetylcholine. **Neuroscience**. 110: 627-639, 2002.

MIYOSHI, E. *et al.* Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Research Bulletin**, 58:41-47, 2002.

MOLTENI, R.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **Eur J Neurosci**, 16:1107-16, 2002.

MOORE, D.J.; WEST, A.B.; DAWSON, V.L. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. **Annu Rev Neurosci**, 28:57-87, 2005.

MORETTO M.B., *et al.* Effect of subchronic treatment with mercury chloride on NTPDase, nucleotidas e and acetylcholinesterase from cerebral cortex of rats. **Journal of Trace Elements in Medicine and biology**.17: 256-260, 2004.

MORRISH, P. K. *et al.* Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with dopa PET. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 64 (3):314-9, 1998.

MOSLEY, R. L. *et al.* Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clin Neurosci Res**, 6:261-281, 2006.

MOTA, W. M. *et al.* Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Rev Bras PI Med**, 14(4):624-628, 2012.

MUELLER, D. *et al.* Biotransformation of diclofenac and effects on the metabolome of primary human hepatocytes upon repeated dose exposure. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** (5): 716-724. 2012.

MUELLER P. T.; VIEGAS C. A. A.; PATUSCO L. A. P. Força muscular como determinante da eficiência do consumo de oxigênio e da máxima resposta metabólica ao exercício em pacientes com DPOC leve/moderada. **J Bras Pneumol**. 2012;38(5):541-549

NAGATSUA, T.; SAWADAB, M. L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. **Parkinsonism Relat Disord**, 15:3-8, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: **Artmed**, p. 731-746, 2014.

NEVES, K. R. T. **Avaliação dos efeitos da pentoxifilina em modelo experimental da doença de Parkinson: uma abordagem comportamental, neuroquímica e imunohistoquímica.** Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2014. p. 133.

O'DELL, S. J. *et al.* Running wheel exercise enhances recovery from nigrostriatal dopamine injury without inducing neuroprotection. **Neuroscience**, 144:1141-1151, 2007.

OBESO, J. A. *et al.* Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. **Mov Disord**, 23:548-559, 2008.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, 95(2):351-8, 1979.

OLANOW, C. W.; STERN, M. B.; SETHI, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. **Neurology**, 72(21 Suppl 4):S1-136, 2009.

OLESEN, J. *et al.* CDBE study group; European Brain Council. The economic cost of brain disorders in Europe. **Eur J Neurol**, 19(1):155-62, 2012.

OPACKA-JUFFRY, J.; WILSON, A.W.; BLUNT, S. B. Effects of pergolide treatment on in vivo hydroxyl free radical formation during infusion of 6-hydroxydopamine in rat striatum. **Brain Res**, 810:27-33, 1998.

OSTMAN, H. N. Adaptive changes in central and peripheral no-adrenergic neurons in rats following chronic exercise. **Neurosci**, 1:41-7, 1976.

OWEN, A. M. Working memory: imaging the magic number four. **Curr Biol**, 14:573-4, 2004.

PACKARD, M. G.; KNOWLTON, B. J. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. **Annu Rev Neurosci**, 25:563-93, 2002.

PAFFENBARGER, R. S. JR. *et al.* The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. **N Engl J Med**, 328(8):538-45, 1993.

PANG, T. Y. C. *et al.* Differential effects of voluntary physical exercise on behavioral and brain-derived neurotrophic factor expression deficits in Huntington's disease transgenic mice. **Neurosci**, 141:569-84, 2006.

PARK, S. J. *et al.* The ameliorating effects of stigmasterol on scopolamine-induced memory impairments in mice. **Eur J Pharmacol**, 676:64-70, 2012.

PARK, S. E. *et al.* Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling. **Neurochemical Research**, 39:707–718, 2014.

PATOČKA, J. *et al.* Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus esters: in vitro kinetics and thermodynamics. **Journal of Applied Biomedicine**, 3:91-99, 2005.

PAXINOS, G.; WATSON, C.O. The rat brain coordinates (**Academic San Diego**), 1986.

PAIXÃO, A. O. *et al.* Doença de Parkinson: uma desordem neurodegenerativa. **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde**, 1(16):57-65, 2013.

PEREIRA, M. C.L. *et al.* Estratégias para neuro-restauração em modelos experimentais de doença de Parkinson. **Einstein**, 5(4): 2007.

PÉREZ, V. *et al.* Effect of the additional noradrenergic neurodegeneration to 6-OHDA lesioned rats in levodopa-induced dyskinesias and in cognitive disturbances. **J Neural Transm (Vienna)**, 116(10):1257-66, 2009.

PERESE, D. A. *et al.* A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. **Brain Res**, 494(2):285-93, 1989.

PETZINGER, G. M. *et al.* Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal

ganglia injury. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, 27 (20):5291–300, 2007.

PREDIGER, R. *et al.* 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, 2011.

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M. 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, 2003.

PETERNELLA, F. M. N.; MARCON, S. S. Descobrimos a Doença de Parkinson: impacto para o parkinsoniano e seu familiar. **Rev Bras Enferm**, 62(1):25-31, 2009.

PLOUGHMAN, M. *et al.* Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. **Neuroscience**, 136:991-1001, 2005.

PLOUGHMAN, M. *et al.* Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia. **Eur J Neurosci**, 25:3453-60, 2007.

POWERS, S. K.; LENNON, S. L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. **Proc Nutr Soc**, 58(4):1025-33, 1999.

POTHAKOS, K.; KURZ, M. J.; LAU, Y. S. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. **BMC neuroscience**, 106, 2009.

POULTON, N. P.; MUIR, G. D. Treadmill training ameliorates dopamine loss but not behavioral deficits in hemi-parkinsonian rats. **Experimental neurology**, 193:181-197, 2005.

POWERS, S. K.; TALBERT, E. E.; ADHIHETTY, P. J. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. **J Physiol**, 589:2129-38, 2011.

PUCHADES, M. *et al.* Unaltered lactate and glucose transporter levels in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **J Parkinsons Dis.** 3(3):371-85, 2013.

PYNE, B; LEE, H; SWANWICK, KM. Monitoring the lactate threshold in world ranked swimmers. **MedSci Sports Exerc.** 2001;33:291-7.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. **Chemical Reviews, Washington**, 87(5):955-979, 1987.

RACHAKONDA. *et al.* Biomarkers of neurodegenerative disorders: How good are they? **Cell Reserch**, 14(5):349-360, 2004.

RADAK, Z. *et al.* Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. **J Appl Physiol (1985)**, 79 (1): 129-35, 1995.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia Trad.**

Raimundo Rodrigues Santos e outros – 6<sup>o</sup>. ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia.** 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.

RAHMAN, I. *et al.* Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European J Pharma**, 533(1-3):222-39, 2006.

REID, M. B. Plasticity in skeletal muscle, and smooth muscle. Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. **J ApplPhysiol**, 90(2):724-31, 2001.

RIBEIRO, R. P. *et al.* Probucol affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, 38:660-668, 2013.

REIJNDERS, J. S. *et al.* A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. **Mov Disord**, 23:183-9, 2008.

RIZELIO, V. *et al.* Lesion of the subthalamic nucleus reverses motor deficits but not death of nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto**, v. 43, n. 1, p. 85-95, 2010.

ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 287(3): R502-16, 2004.

RODRIGUES, M.; CAMPOS, L. C. Tegyl for treatment with levodopa in Parkinson's disease. **Revista Analytica**, 5(23):121–129, 2006.

ROJO, A. I. *et al.* Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. **The European journal of neuroscience**, 24 (7):1874-84, 2006.

ROSLAND, J. H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacology & Toxicology, Denmark**, 66(5):382-386, 1990.

ROUSSEAU, M. W. *et al.* Progressive dopaminergic cell loss with unilateral-to-bilateral progression in a genetic model of Parkinson disease. **Proc Natl Acad Sci USA**, 109(39):15918-23, 2012.

RUBERT, V. A.; REIS, C.; ESTEVES, C. A. Doença de Parkinson e exercício físico. **Rev Neurocienc**, 15:141-146, 2007.

SCHEFFER, D. L. **O papel da dopamina no desenvolvimento de fadiga em modelo experimental de doença de Parkinson.** Dissertação (Mestrado em Educação Física). Programa de Pós-graduação em Educação Física da Universidade Federal de Santa Catarina, 2013. p. 91.



SEDLAK J.; LINDSAY R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, 25:192-195, 1968.

SEIDI, S. E.; POTASHKIN, J. A. The promise of neuroprotective agents in Parkinson's disease. **Frontiers in Neurology, Lausanne**, 2:68, 2011.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, 11:151–167, 2007.

SHOBANA, C.; KUMAR, R.R.; SUMATHI, T. Alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. Protects against 6-hydroxydopamine-induced changes in behavioral and biochemical aspects: a pilot study. **Cell Mol Neurobiol**, 32:1099-112, 2012.

SMITH, A. D. ; ZIGMOND, M. J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. **Experimental Neurology**, 184:31–39, 2003.

SMITH, B. A.; GOLDBERG, N. R. S.; MESHUL, C. K. 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, 2011.

SOMANI, S. M. *et al.* Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. **Alcohol**, 13:603-10, 1996.

SOUZA; Paula Monteiro de 2011. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma Cerrado**. Dissertação mestrado (Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, 2011.

WEI, S. *et al.* The impact of non-motor symptoms on the health-related quality of life of parkinson's disease patients from Southwest China. **Parkinsonism and related disorders**, 20:149-152, 2014.

SCHOBBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Research, Berlin**, 318(1):215-224, 2004.

SCHWARTING, R.K.W.; HUSTON, J.P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analyses of functional deficits, recovery and treatments. **Progress in Neurobiology**, 50:275-331, 1996.

SCHAPIRA, A. H. Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. **Experimental Neurology**, 224:331–335, 2010.

SCHAPIRA, A.H.; JENNER, P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 26:1049–1055, 2011.

SHIMOHAMA, S. *et al.* Disease model: Parkinson's disease. **Trends Mol Med**, 9:360-365, 2003.

SHOBANA, C.; KUMAR, R.R.; SUMATHI, T. Alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. Protects against 6-hydroxydopamine-induced changes in behavioral and biochemical aspects: a pilot study. **Cell Mol Neurobiol**, 32:1099-112, 2012.

SINGH, S. *et al.* Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. **The Indian Journal of Medical Research, New Delhi**, v. 124, n. 4, p. 419-426, 2006.

SMITH, A.D.; ZIGMOND, M.J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. **Experimental Neurology**, 184:31-39, 2003.

SPEELMAN, A.D. *et al.* How might physical activity benefit patients with Parkinson disease? **Nat Rev Neurol**, 7(9):528-34, 2011.

SRIVASTAVA, G. *et al.* Resveratrol potentiates cytochrome P450 2 d22-mediated neuroprotection in maneb- and paraquat-induced parkinsonism in the mouse. **Free Radical Biology & Medicine**, 52:1294–1306, 2012.

STOCCHI, F. The hypothesis of the genesis of motor complications and continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, 15: 9-15, 2009.

STONE, W.S.; WALSER, B.; GOLD, S.D.; GOLD, P.E. Scopolamine- and morphine-induced impairments of spontaneous alternation performance in mice: reversal with glucose and with cholinergic and adrenergic agonists. **Behav Neurosci**, 105:264–271, 1991.

SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, 30:244–250, 2007.

SUREDA, *et al.* Effects of exercise intensity on lymphocyte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and antioxidant defences in soccer players. **Br J Sports Med**, 43(3):186-90, 2009.

STEBBINS, G. T. *et al.* Delayed recognition memory in Parkinson's disease: a role for working memory? **Neuropsychologia**, 37:503-10, 1999.

TADAIESKY, M.T. **A lesão dopaminérgica como modelo de estágio pré-motor da doença de Parkinson: efeitos do antagonismo do receptor CB1/Meigy**  
Tavares Tadaiesky; Orientador, Reinaldo Naoto Takahashi. UFSC, Tese Doutorado - Florianópolis, SC, 2010.

TAJIRI, N. *et al.* DATE I. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. **Brain Res**, 1310:200-7, 2010.

TAKAHASHI, H.; WAKABAYASHI, K. The cellular pathology of Parkinson's disease. **Neuropathology**, 21:315-322, 2001.

TAMILSELVAM, K. *et al.* Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 1-11, 2013.

TAYLOR, P. et al. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Lippincott-RavenPublishers, 214-242, 1999.

TEIXEIRA, P. S. A. **Caracterização do treinamento físicoexperimental de *endurance* em esteira adaptadaatravés de marcadores metabólicos energéticos.** f 172. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará, 2010.

TEGTBUR, U; BUSSE, MW; BRAUMANN, KM. Estimation of an individual equilibrium between lactate production and catabolism during exercise. **Med Sci Sports Exerc.** 1993;25:620-7.

THAKUR, P.; NEHRU, B. Modulatory effects of sodium salicylate on the factors affecting protein aggregation during rotenone induced Parkinson's disease pathology. **Neurochemistry International**, 75:1-10, 2014.

TILLERSON, J.L. *et al.* Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 119:899-911, 2003.

TILLERSON, J.L. *et al.* Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6- hydroxydopamine. **J Neurosci**, 21:4427-4435, 2001.

TOGO, T. *et al.* Glial involvement in the degeneration process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies. **J Neurol Sci**, 184:71-75, 2001.

TREJO, J.L. *et al.* Sedentary life impairs self-reparative processes in the brain: the role of serum insulin-like growth factor-I. **Rev Neurosci**, 13:365-74, 2002.

TRIPANICHKUL, W.; GERDPRASERT, O.; JAROENSUPPAPERCH, E. O. Estrogen reduces the level of BDNF but maintains dopaminergic cell density in the striatum of MPTP mouse model. **Int J Neurosci**, 120 (7): 489-95, 2010.

TSANG, A.H.; CHUNG, K.K. Oxidative stress and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta**, 1792:643-650, 2009.

TUON, T. *et al.* Effects of moderate exercise on cigarettesmoke exposure-induced hippocampal oxidative stress values and neurological behaviors in mice. **Neurosci Lett**, 475:16-29, 2010.

TUON, T. *et al.* Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 227: 305-312, 2012.

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

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G.W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Res**, 24:485-493, 1970.

VAI, B.; BOLLETTINI, I.; BENEDETTI, F. Corticolimbic connectivity as a possible biomarker for bipolar disorder. **Expert Rev Neurother**, 14 (6):631-50, 2014.

VAN PRAAG, H. Exercise and the Brain: something to Chew On. **Trends Neurosci**, 32:283-90, 2009.

VILLANUEVA, C.; KROSS, R. D. Antioxidant-Induced Stress. **Int J Mol Sci**, 13:2091-2109, 2012.

VILLAR-CHEDA, B. *et al.* Aging and sedentarism decrease vascularization and VEGF levels in the rat substantia nigra. Implications for Parkinson's disease. **J Cereb Blood Flow Metab**, 29:230-4, 2009.

WASSERMAN, K; MCILROY, MB. Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **Am J Cardiol**. 1964; 14:844.

WEINTRAUB, D.; COMELLA, C. L.; HORN, S. Parkinson's disease – Part III: Neuropsychiatric symptoms. **Am J Manag Care**, 14:S59-S69, 2008.

WIETZIKOSKI, E. C. **Estudo comparativo do comportamento ipsiversivo econtraversivo nos modelos da 6-ohda e mptp da doença de Parkinson.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, 2006.p. 89.

WINNER, B. *et al.* Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. **Exp Neurol**, 219:543-552, 2009.

WIRDEFELDT, K. *et al.* Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol**, 26: S1-S58, 2011.

WU, S. Y. *et al.* Running exercise protects the substantia nigra dopaminergic neurons against inflammation-induced degeneration via the activation of BDNF signaling pathway. **Brain Behav Immun**, 25(1):135-46, 2011.

XU, K.; BASTIA, E.; SCHWARZSCHILD, M. A. Therapeutic potential of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease. **Pharmacol Ther**, 105:267-310, 2005.

YAMADA, K. *et al.* The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, 276(2):460-466, 1996.

YOON, M. C. *et al.* Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Neurosci Lett**, 423:12-17, 2007.

YU-MIHEO. *et al.* Treadmill Exercise Ameliorates Short-Term Memory Disturbance in Scopolamine-Induced Amnesia Rats. **Korean Continence Society**. 2014 (17)

HEO, Y. M. *et al.* Treadmill Exercise Ameliorates Short-Term Memory Disturbance in Scopolamine-Induced Amnesia Rats. **Int Neurolog J**, 18(1):16-22, 2014.

ZHANG, Q.J. *et al.* The pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex show decreased response to 5-hydroxytryptamine-3 receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. **Brain Research**, 13(84):69-79, 2011.

ZHU, Y.; ZHANG, J.; ZENG, Y. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. **CNSNeurol Disord Drug Targets**, 11(4):350-8, 2012.

Zhou, X. *et al.*, Brain-derived neurotrophic factor and trkB signaling in parasympathetic neurons: relevance to regulating  $\alpha 7$ -containing nicotinic receptors and synaptic function. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, 24(18), 4340–50 2004.



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 90/2014, sobre o projeto intitulado: “**AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS EFEITOS BENÉFICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA LESÃO ESTRIATAL UNILATERAL POR 6-OHDA MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON), EM RATOS**” de responsabilidade da Profª. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 07 de agosto de 2014.

Fortaleza, 07 de agosto de 2014

Profª. Dra. Nylane  Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profª. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar  
Coordenadora da CEPADFF/FAMED/UFC  
MAT. SIAPE 2166369