



**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 ASSOCIADO À  
SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D NA LESÃO ESTRIATAL UNILATERAL  
POR 6-OHDA EM RATOS**

**FORTALEZA- CE**

**2022**

**ROBERTA OLIVEIRA DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ASSOCIADO À  
SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D NA LESÃO ESTRIATAL UNILATERAL  
POR 6-OHDA EM RATOS**

**Tese de Doutorado 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 Doutora em Ciências  
Morfofuncionais. Área de concentração:  
Neurociência.**

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

**Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira  
(Coorientador)**

**FORTALEZA - CE**

**2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- C875a Costa, Roberta Oliveira da.  
Avaliação dos efeitos do exercício físico associado à suplementação com vitamina D na lesão estriatal unilateral por 6-ohda em ratos / Roberta Oliveira da Costa. – 2022.  
215 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Glauce Socorro de Barros Viana.  
Coorientação: Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira.
1. Doença de Parkinson. 2. Exercício Físico. 3. Neuroproteção. 4. Vitamina D. 5. Oxidopamina. I. Título.

CDD 611

---

**ROBERTA OLIVEIRA DA COSTA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO ASSOCIADO À  
SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D NA LESÃO ESTRIATAL UNILATERAL  
POR 6-OHDA EM RATOS**

Tese de Doutorado 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 Doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Neurociência.

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientadora)**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof. Dr. Gilberto Santos Cerqueira (Coorientador)**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos**  
**Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof. Dr. Jose Eduardo Ribeiro Honório Júnior.**  
**Centro Universitário Christus – (Unichristus)**

Dedico este trabalho a todas as mulheres que tiveram seus sonhos ceifados por uma sociedade arraigada de preconceitos estruturais que tentam estabelecer onde deve estar e o que uma mulher deve ser. Dedico à mulher pobre, mulher mãe, mulher esposa, mulher profissional, mulher de diferentes classes, raças e contextos sociais. Ninguém poderá calar nossa voz ou nosso desejo de vencer. Acreditem, somos a resistência.

## AGRADECIMENTO

As palavras parecem ser insuficientes para agradecer de forma justa todos que me acompanharam ao longo deste árduo caminho de aprendizagem, lutas, conquistas, quedas e recomeço. Sim, recomeço às vezes é necessário. Recomeçar para desconstruir e reconstruir na jornada que chamamos de vida.

Agradeço primeiramente a Deus Pai Criador, que permite cada segundo da minha existência, por me acalentar e colocar nos braços, por permitir todas as situações sejam ruins ou boas, por me ensinar a não desistir, por me ensinar em cada dificuldade que posso ser uma pessoa melhor e que as dificuldades não me definem, mas me formam e transformam.

Aos meus pais, Roberto Oliveira e Maria Geisa Pereira, casal simples, gratidão aos numerosos sacrifícios, por me ensinarem a sonhar e acreditar que, independente da condição social, eu poderia ser uma pessoa grande, em humildade, perseverança e que minha riqueza não estaria em uma conta bancária, mas nas trajetórias e lutas escritas e vividas ao longo da vida. Obrigada pela dedicação, por acreditarem em meus sonhos, disponibilizando os poucos recursos que tinham em prol dos meus estudos. Meu eterno agradecimento por nunca me deixarem esquecer de onde venho e quem sou. Filha de pais simples, mas de corações grandiosos, portadores do maior diploma, humildade e sabedoria. Sou grata e orgulhosa por ter pais tão especiais e inspiradores. Para sempre obrigada!

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 não acreditei que seria capaz. Obrigada por acreditar sempre em meu potencial, mais que eu mesma posso acreditar. Obrigada pelo apoio incondicional, incentivo, por cada cuidado, pelo zelo e dedicação. Gratidão por fazer meus sonhos também os seus!

Aos meus presentes de Deus, Geovani Orcini, Alice Orcini e Saul Orcini que, embora tão pequenos, me ensinam em todos os dias da minha pequena existência a ser uma pessoa muito melhor. Obrigada por tornarem minhas lutas repletas de sentido. Obrigada por me mostrarem o quanto posso ser forte para resistir, persistir e recomeçar.

Aos meus irmãos, Rejane Oliveira, Pedro Lucas, Max e Janaina Pereira que sempre acreditaram em meus sonhos. Às minhas cunhadas Naíla Moura e Lúcia Helena. À minha sogra Bernadete Moura e sobrinhos amados Ayane e Naiton, vocês

coloriram minha vida quando tudo parecia não ter cor, reavivaram em meu coração a certeza do milagre diário, me encorajaram a continuar com cada gesto de acolhimento e amor. Obrigada por nunca soltarem minhas mãos!

A minha orientadora Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, pelo apoio e inspiração diária. Suas orientações e seu apoio foram de valor inestimável. Obrigada por tudo!

Ao meu Coorientador Gilberto Cerqueira, a quem posso chamar de amigo, obrigada por acreditar em mim e por me apresentar a pesquisa experimental. Obrigada por segurar sempre em minha mão, por cada palavra de incentivo, por ficar ao meu lado mesmo quando não tinha nada para oferecer. Obrigada por ser um ser humano incrível que enxerga além do material, por mostrar o quanto podemos e devemos lutar pelos nossos sonhos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais, em especial Dra. Roberta e Dra. Renata Leitão 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, Paula Góis, Delane, Gilberto Cerqueira e Emanuel 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.

Aos meus companheiros e amigos, Dr. José Eduardo Ribeiro Honório, Dra. Dayane Pessoa de Araújo e Prof. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro

A minha professora, pesquisadora e amiga Dra. Patricia Feitosa que me apresentou e encorajou para o mundo da pesquisa e da docência no ensino superior. Obrigada por ser minha inspiração diária, como pessoa, mulher e profissional. Obrigada por tudo!

À 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.

Aos meus amigos, Josy, Pedro, Ludimilla, Tatiana, Jalles Dantas, Talita, Dayane Pessoa e Ayane Costa, agradeço a amizade que, gentilmente, vocês me permitiram desfrutar.

Aos meus alunos que sempre me motivaram, e me encheram de amor diariamente na longa e difícil jornada de ser professora. Obrigada por cada abraço, sorriso, palavra carinhosa, brincadeira, ações que muitas vezes me fizeram esquecer o cansaço e as tristezas. Obrigada por sempre reavivarem a certeza de ser professora, por me ajudarem a cada aula a amar meu ofício de ensinar e aprender.

Ao Colégio Liceu de Maracanaú, em especial ao diretor Sérgio Banhos, coordenadores, Paula, Rafaela, Cleiton, e às professoras Geanne e Andressa. Ao Centro Universitário na Pessoa do coordenador do curso de Educação Física professor Jurandir Fernandes Cavalcante.

Ao biotério do NPDM e DFF em especial ao Wesley e Augusto.

Ao bolsista do laboratório, Carlos Vinícios 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 pesquisa.

A todos, que compõem o Laboratório de Neurofarmacologia, 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.

À FUNCAP/CNPq, pelo incentivo científico e apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio no doutorado.

A banca examinadora, pelo aceite do convite e colaboração. Gratidão.

“Tente uma, duas, três e se possível a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só nunca desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar onde a maioria não chega. Faça o que a maioria não faz.”

**Bill Gates**

“Recomece! Se refaça! Relembre o que foi bom. E se um dia lá na frente, a vida der uma ré, recupere a sua fé, e recomece novamente.”

**Bráulio Bessa**

“Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.”

**Eclesiastes**

Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.

**Albert Einstein**

“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários”

**C.S Lewis**

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa originada pela perda de células dopaminérgicas na via nigroestriatal, com uma acentuada redução no conteúdo de dopamina (DA) no corpo estriado. Na busca de novas estratégias de tratamento, o exercício físico e a suplementação da Vitamina D (VD), tem demonstrados numerosos benefícios para o cérebro, podendo atuar como modulador de neurogênese, plasticidade neuronal, além de apresentar uma forte atividade antioxidante. Neste cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do exercício físico associado à suplementação da VD na lesão estriatal unilateral por 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos. Para este fim, ratos machos *Wistar* foram distribuídos em 6 grupos: falso operado (FO) sem exercício (S/E), falso operado (FO) com exercício (C/E), 6-OHDA sem exercício (S/E), 6-OHDA com exercício (C/E), 6-OHDA com exercício (S/E) e com VD, 6-OHDA com exercício (C/E) e VD, 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 21 dias, por 30 min em esteira, com velocidade de 20 cm/s iniciando-se 24h após o procedimento cirúrgico. A administração oral de VD, aconteceu diariamente no volume de 0,1 mL/10 g de peso. A dose utilizada no animal VD (1µg/kg/dia), por 21 dias. Após a aplicação dos protocolos de tratamento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (apomorfina, rotarod, campo aberto, cilindro, y-maze, reconhecimento de objeto) 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 pelo teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade. Os dados não paramétricos avaliados através do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunn, enquanto, os dados paramétricos foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. Em todas as análises, foram consideradas, estatisticamente significantes, valores de  $p < 0,05$ . Os resultados evidenciaram que o exercício físico associado à suplementação de VD, reduziu o comportamento rotacional induzido pela apomorfina, e protegeu de déficits motores e cognitivos (memória de trabalho e de curta duração). Além disso, aumentaram os níveis de DA. Quanto ao estresse oxidativo, promoveu uma redução nos conteúdos de malondialdeído (MDA) e na produção de nitrito/nitrato e aumento das concentrações de GSH. No estudo imunohistoquímico, exercício físico e suplementação de VD preveniu a morte de neurônios dopaminérgicos no corpo estriado lesionado, e aumentou a imunorreatividade para Tirosina hidroxilase (TH), Transportador de Dopamina (DAT) e Fator neurotrófico derivado da glia (GDNF). Assim como, à inibição de neurônios imunorreativos para Proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e Alfa-sinucleína. Em conclusão, mostramos que as alterações comportamentais e neuroquímicas em ratos hemiparkinsonianos foram prevenidas com a aplicação do exercício físico e suplementação com VD, atenuaram a diminuição das concentrações de DA no estriado, caracterizando um potencial efeito neuroprotetor no modelo experimental de DP.

**Palavras-chaves:** Doença de Parkinson. Exercício Físico. Neuroproteção. Vitamina D. Oxidopamina.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder caused by the loss of dopaminergic cells in the nigrostriatal pathway, with a marked reduction in dopamine (AD) content in the striated body. In the search for new treatment strategies, physical exercise and vitamin D (VD) supplementation has shown numerous benefits for the brain, and can act as a modulator of neurogenesis, neuronal plasticity, besides presenting a strong antioxidant activity. In this scenario, the present study aimed to evaluate the effects of physical exercise associated with VD supplementation on unilateral striatal injury by 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) in rats. For this purpose, male Wistar rats were distributed into 6 groups: false operated (FO) without exercise (S/E), false operated (FO) with exercise (C/E), 6-OHDA without exercise (S/E), 6-OHDA with exercise (C/E), 6-OHDA with exercise (S/E) and with VD, 6-OHDA with exercise (C/E) and VD, who received injections of 6-OHDA (12 µg/2µl) or saline solution (FO), in the right striatum through stereotactic surgery. The exercise protocol was performed for 21 days, for 30 min on a treadmill, with a speed of 20 cm/s starting 24 hours after the surgical procedure. Oral administration of VD occurred daily at a volume of 0.1 mL/10 g of weight. The dose used in the animal VD (1µg/kg/day) for 21 days. After the application of treatment protocols, the animals were submitted to behavioral tests (apomorphine, rotarod, open field, cylinder, y-maze, object recognition) and euthanized, the cerebral areas, prefrontal cortex (CPF), hippocampus (HP) and striated body (CE) used for neurochemical and immunohistochemical determinations. Behavioral and neurochemical data were analyzed by the Shapiro-Wilk test to verify normality. The nonparametric data evaluated using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-hoc test, while parametric data were analyzed by variance analysis (ANOVA) of a pathway, followed by tukey's post-hoc test for multiple comparisons. In all analyses,  $p < 0.05$  values were considered statistically significant. The results showed that physical exercise associated with VD supplementation reduced rotational behavior induced by apomorphine, and protected from motor and cognitive deficits (working memory and short duration). In addition, AD levels have increased. As for oxidative stress, it promoted a reduction in malondialdehyde (MDA) contents and nitrite/nitrate production and increased GSH concentrations. In the immunohistochemical study, physical exercise and VD supplementation prevented the death of dopaminergic neurons in the injured striated body, and increased immunoreactivity for Tyrosine hydroxylase (TH), Dopamine Transporter (DAT) and Glial-derived neurotrophic factor (GDNF). As well as, the inhibition of immunoreactive neurons for glial fibrillar acid protein (GFAP) and Alpha-synuclein. In conclusion, we showed that behavioral and neurochemical changes in Hemiparkinsonian rats were prevented with the application of physical exercise and vd supplementation, attenuating the decrease in AD concentrations in the striatum, characterizing a potential neuroprotective effect in the experimental PD model.

**Key words:** Parkinson's disease. Physical exercise. Neuroprotection. Vitamin D. Oxydopamine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 -</b>	Sistema Nervoso Central: substância negra e Neurônio Dopaminérgico.....	26
<b>Figura 2 -</b>	Sistema Nervoso Central: via nigroestriatal.....	27
<b>Figura 3 -</b>	Sintomas motores e não motores da Doença de Parkinson.....	29
<b>Figura 4 -</b>	Estrutura e localização dos Núcleos da Base (NB).....	30
<b>Figura 5 -</b>	Representação dos sistemas dopaminérgicos: nigroestriatal, mesolímbico, mesocortical e tuberoinfundibular .....	31
<b>Figura 6 -</b>	Corpo Estriado (CE) e liberação de dopamina (DA).....	32
<b>Figura 7 -</b>	Ausência da Substância Negra na Doença de Parkinson .....	32
<b>Figura 8 -</b>	Circuito do Núcleo da Base normal (A); Circuito do Núcleo da Base Doença de Parkinson (B).....	34
<b>Figura 9 -</b>	Via de produção da dopamina .....	35
<b>Figura 10 -</b>	As principais alterações neuropatológicas observadas na doença de Parkinson (DP).....	36
<b>Figura 11-</b>	Estresse Oxidativo na Célula .....	39
<b>Figura 12 -</b>	Tratamento farmacológico e efeitos colaterais na DP.....	42
<b>Figura 13 -</b>	Mecanismo hipotético de toxicidade 6-OHDA .....	46
<b>Figura 14 -</b>	Esquema mostrando a via nigroestriatal do cérebro de rato .....	47
<b>Figura 15 -</b>	Nomenclaturas da vitamina D.....	54
<b>Figura 16 -</b>	Principais processos metabólicos envolvidos na ativação da vitamina D e os tecidos nos quais ela atua.....	55
<b>Figura 17 -</b>	Representação esquemática procedimento cirúrgico de estereotaxia.....	64
<b>Figura 18 -</b>	Representação esquemática de diferentes locais no rato e cérebros humanos.....	64
<b>Figura 19 -</b>	Aparelho estereotáxico .....	65
<b>Figura 20 -</b>	Figura esquemática representativa das 3 coordenadas estereotáxicas para injeção intracraniana de 6-OHDA .....	66
<b>Figura 21 -</b>	Canula de gavagem.....	67

<b>Figura 22</b> - Esteira automatizada constituída de 3 raia.....	69
<b>Figura 23</b> - Perda parcial de receptores de neurônios dopaminérgicos nigroestratais.....	73
<b>Figura 24</b> - Aparelho <i>rotarod</i> .....	74
<b>Figura 25</b> - Arena do teste de campo e parâmetro avaliados.....	75
<b>Figura 26</b> - Animal durante o movimento de rearing no Teste do Cilindro .....	76
<b>Figura 27</b> - <i>Teste Labirinto em Y (Y- Maze)</i> .....	77
<b>Figura 28</b> - Teste Reconhecimento de objeto.....	79
<b>Figura 29</b> - Guilhotina.....	80
<b>Figura 30</b> - Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre o comportamento rotacional (contralateral) induzido por apomorfina (3mg/kg, i.p.) em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA .....	90
<b>Figura 31</b> - Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre atividade locomotora avaliada no teste <i>rotarod</i> , em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	92
<b>Figura 32</b> - Efeito do exercício físico e suplementação com VD no comportamento exploratório horizontal (número de cruzamentos), avaliado no teste campo aberto em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA .....	94
<b>Figura 33</b> - Efeito do exercício físico e suplementação com VD no comportamento exploratório vertical ( <i>rearing</i> ), avaliado no teste campo aberto, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	95
<b>Figura 34</b> - Efeito do exercício físico e suplementação com VD no comportamento <i>grooming</i> , avaliada no teste campo aberto, em rato com lesão unilateral por 6-OHDA .....	96
<b>Figura 35</b> - Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre a avaliação da distância percorrida, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA .....	98
<b>Figura 36</b> - Imagens da trajetória percorrida durante o teste campo aberto em animais submetidos ao modelo de 6-OHDA .....	99
<b>Figura 37</b> - – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre a avaliação do cilindro, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA...	101
<b>Figura 38</b> - Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre a avaliação de memória operacional, no teste Y-maze, em ratos	

	com lesão unilateral por 6-OHDA.....	103
<b>Figura 39 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação com VD no teste de reconhecimento de objeto, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA .....	105
<b>Figura 40 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre as concentrações estriatais de DA, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA .....	107
<b>Figura 41 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre as concentrações estriatais de DOPAC, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	108
<b>Figura 42 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação com VD na peroxidação lipídica (TBARS) de córtex pré-frontal (CPF), em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	110
<b>Figura 43 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação com VD na peroxidação lipídica (TBARS) em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	110
<b>Figura 44 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação com VD na peroxidação lipídica (TBARS) em corpo estriado esquerdo (CE)....	112
<b>Figura 45 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação de VD sobre dosagem de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	114
<b>Figura 46 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre dosagem de nitrito/nitrato em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA .....	115
<b>Figura 47 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre dosagem de nitrito/nitrato em corpo estriado direito (CE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	116
<b>Figura 48 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre as concentrações de GSH em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	118
<b>Figura 49 -</b>	Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre as concentrações de GSH em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	119
<b>Figura 50-</b>	– 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 com exercício e suplementação de VD.....	121
<b>Figura 51 -</b>	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 e suplementação com VD.....	122
<b>Figura 52 -</b>	Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunorreatividade para DAT em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD.....	124
<b>Figura 53 -</b>	Quantificação da imunomarcção para dopamina (DAT) no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD.....	125
<b>Figura 54 -</b>	Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunoreatividade para GFAP em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD.....	127
<b>Figura 55 -</b>	Quantificação da imunomarcção para GFAP no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD.....	128
<b>Figura 56 -</b>	Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunorreatividade para GDNF em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício com suplementação de VD.....	130
<b>Figura 57 -</b>	Quantificação da imunomarcção para GDNF no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD.....	131
<b>Figura 58 -</b>	Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunorreatividade para Alfa-sinucleína em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou	

	não ao protocolo de exercício com suplementação com VD.....	133
<b>Figura 59 -</b>	Quantificação da imunomarcção para Alfa-sinucleína no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD.....	134
<b>Figura 60 -</b>	Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunorreatividade para RVD no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício com suplementação de VD.....	136
<b>Figura 61 -</b>	Quantificação da imunomarcção para RVD no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD.....	137
<b>Figura 62 -</b>	Modelo esquemático dos efeitos do exercício físico esteira e suplementação de VD no modelo experimental de DP induzido por 6-OHDA.....	174

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1 –</b>	Sítios das lesões estriatais unilaterais com 6-OHDA .....	65
<b>Quadro 2 –</b>	Divisão dos Grupos, protocolo de Exercício Físico Suplementação com Vitamina D .....	68
<b>Quadro 3 –</b>	Representação esquemática dos efeitos do exercício físico esteira e suplementação de VD nas alterações comportamentais (testes do campo aberto, rotarod e cilindro) em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	129
<b>Quadro 4 –</b>	Representação esquemática dos efeitos do exercício físico esteira e suplementação de VD em alterações comportamentais (testes de Y-maze e reconhecimento de objeto) em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	170
<b>Quadro 5 –</b>	Representação esquemática dos efeitos do exercício físico esteira e suplementação de VD nos níveis de dopamina (DA)	

	e DOPAC no corpo estriado de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	171
<b>Quadro 6 –</b>	. Representação esquemática dos efeitos do exercício físico esteira e suplementação de VD sobre a peroxidação lipídica (TBARS) e nos níveis de NITRITO e GSH no corpo estriado de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	172
<b>Quadro 7 –</b>	. Representação esquemática dos efeitos do exercício físico esteira e suplementação de VD sobre imunomarcagem de TH, DAT, GFAP, GDNF, alfa-sinucleína e receptor de VD em corpo estriado de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	173

#### **LISTAS DE ESQUEMAS**

<b>Esquema 1 –</b>	Grupo 1: Desenho Experimental.....	70
<b>Esquema 2 –</b>	Grupo 2: Desenho Experimental.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>6-OHDA</b>	6-hidroxidopamina
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATC</b>	Ácido tricloro acético
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BDNF</b>	Fator neurotrófico derivado do cérebro
<b>CE</b>	Corpo estriado
<b>C/E</b>	Com exercício
<b>CED</b>	Corpo estriado direito
<b>CEE</b>	Corpo estriado esquerdo
<b>Cm</b>	Centímetro
<b>COMT</b>	Catecol O-metiltransferase
<b>CONCEA</b>	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais da UFC
<b>CP</b>	Caudado-putâmen
<b>CPF</b>	Córtex pré-frontal
<b>D1</b>	Receptor de dopamina do tipo 1
<b>D2</b>	Receptor de dopamina do tipo 2
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DAT</b>	Transportador de Dopamina
<b>DH</b>	Doença de <i>Huntington</i>
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>DOPAC</b>	Ácido didroxifenilacético
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>DTNB</b>	Ditiobisnitrobenzóico
<b>DRI</b>	<i>Dietary Reference Intakes</i>
<b>EM</b>	Esclerose múltipla
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>ERN</b>	Espécies reativas ao nitrogênio

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

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

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>1.1</b>	<b>Doença de Parkinson</b> .....	<b>24</b>
<b>1.2</b>	<b>Fisiopatologia da Doença de Parkinson</b> .....	<b>35</b>
<b>1.3</b>	<b>Estresse Oxidativo na Doença de Parkinson</b> .....	<b>38</b>
<b>1.4</b>	<b>Tratamento da Doença de Parkinson</b> .....	<b>40</b>
<b>1.5</b>	<b>Modelos Experimentais: 6-OHDA</b> .....	<b>44</b>
<b>1.6</b>	<b>Exercício Físico e Doença de Parkinson</b> .....	<b>48</b>
<b>1.7</b>	<b>Doença de Parkinson e suplementação de VD</b> .....	<b>54</b>
<b>1.8</b>	<b>Relevância e Justificativa</b> .....	<b>59</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>61</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>61</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>61</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais</b> .....	<b>63</b>
<b>3.2</b>	<b>Drogas e Reagentes</b> .....	<b>63</b>
<b>3.3</b>	<b>Cirurgia Estereotáxica: Injeção Estereotáxica Unilateral com 6-OHDA</b>	<b>63</b>
<b>3.4</b>	<b>Procedimento Experimental</b> .....	<b>66</b>
<b>3.4.1</b>	<b><i>Suplementação com VD</i></b> .....	<b>66</b>
<b>3.4.2</b>	<b><i>Protocolo de Exercício Físico Esteira e suplementação com VD</i></b> .....	<b>67</b>
<b>3.5</b>	<b>Testes comportamentais</b> .....	<b>69</b>
<b>3.5.1</b>	<b><i>Teste rotacional com apomorfina</i></b> .....	<b>72</b>
<b>3.5.2</b>	<b><i>Teste rotarod</i></b> .....	<b>73</b>
<b>3.5.3</b>	<b><i>Teste de Campo Aberto (OPEN FIELD) – Atividade Locomotora Espontânea</i></b> .....	<b>74</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Teste do Cilindro (Limb-use Asymmetry Test) (Adaptado de SCHALLERT <i>et al.</i>, 2000)</b> .....	<b>75</b>
<b>3.5.5</b>	<b><i>Teste Labirinto em Y (Y- Maze) (STONE et al., 1991)</i></b> .....	<b>76</b>
<b>3.5.6</b>	<b><i>Teste Reconhecimento de objeto</i></b> .....	<b>77</b>
<b>3.6</b>	<b>Dissecações das áreas cerebrais</b> .....	<b>79</b>
<b>3.6.1</b>	<b><i>Áreas cerebrais para testes neuroquímicos e imunohistoquímicos</i></b> .....	<b>79</b>
<b>3.7</b>	<b>Determinação da concentração de monoaminas (DA) e seu</b>	

	metabólito (DOPAC) com HPLC .....	81
3.8	Determinação da peroxidação lipídica (TBARS) (DRAPER; HADELY, 1990) .....	82
3.9	Determinação de Nitrito (GREEN <i>et al.</i> , 1982) .....	82
3.10	Determinação da concentração de glutatona reduzida (GSH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968) .....	83
3.11	Análises Imuno-histoquímicas .....	84
3.11.1	Tirosina Hidroxilase (TH).....	84
3.11.2	<i>Transportador de dopamina (DAT)</i> .....	84
3.11.3	<i>Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)</i> .....	85
3.11.4	<i>Fator neurotrófico derivado da glia (GDNF)</i> .....	85
3.11.5	Alfa-sinucleína.....	86
3.11.6	Receptor de vitamina D (VDR) .....	86
3.12	Aquisição de Imagens, Densidade Óptica (DO) .....	87
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	88
5	RESULTADOS.....	89
5.1	Resultados de comportamento locomotor e memória em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA.....	89
5.1.1	Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD no comportamento rotacional induzido pela apomorfina em rato com lesão unilateral por 6-OHDA .....	89
5.1.2	Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre atividade locomotora no teste <i>rotarod</i> em ratos lesionados com 6-OHDA.....	91
5.1.3	Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre o teste campo aberto (número de cruzamentos, <i>grooming</i> e <i>rearing</i> ) em ratos lesionados com 6-OHDA.....	93
5.1.4	Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre o teste de distância percorrida no campo aberto.....	97
5.1.5	Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre a avaliação do Cilindro, em ratos lesionados com 6-OHDA.....	100
5.1.6	Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre a memória operacional, <i>Y-maze</i> em ratos lesionados com 6-OHDA	

.....	102
<b>5.1.7</b>	<b>Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD no comportamento reconhecimento de objeto em ratos lesionados com 6-OHDA..... 104</b>
<b>5.2</b>	<b>Resultados neuroquímicos em rato com lesão unilateral por 6-OHDA..... 106</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Determinação das concentrações de dopamina (DA) e seu metabólito DOPAC nos corpos estriados de ratos com lesão por 6-OHDA, submetidos ao protocolo de exercício físico esteira e suplementação com VD..... 106</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD na peroxidação lipídica (TBARS) em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado direito (CE) de ratos lesionados com 6-OHDA..... 109</b>
<b>5.2.3</b>	<b>Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre dosagem de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) corpo estriado direito (CE) de ratos lesionados com 6-OHDA..... 113</b>
<b>5.2.4</b>	<b>Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CE) de ratos lesionados com 6-OHDA..... 117</b>
<b>5.3</b>	<b>Resultados de Imunohistoquímica em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA..... 120</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre a imunorreatividade para a tirosina hidroxilase (TH) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... 120</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Efeito do exercício esteira e suplementação com VD sobre a atividade do transportador de dopamina (DAT) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA..... 123</b>
<b>5.3.3</b>	<b>Efeito do exercício esteira e suplementação com VD sobre células GFAP positivas no corpo estriado de ratos lesionados com 6-</b>

	<b>OHDA.....</b>	<b>126</b>
<b>5.3.4</b>	<b>Efeito do exercício esteira e suplementação com VD sobre células GDNF.....</b>	<b>129</b>
<b>5.3.5</b>	<b>Efeito do exercício esteira e suplementação com VD sobre células Alfa-sinucleína.....</b>	<b>132</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>138</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>175</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>176</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>177</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>215</b>
	<b>Aprovação CEUA.....</b>	<b>215</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é descrita como a segunda doença neurodegenerativa com maior prevalência no mundo, após a doença de Alzheimer, com ocorrência mundial em torno de 1 e 20, a cada 1000 indivíduos/ano, atingindo cerca de 1% da população acima de 60 anos (SEER et al., 2016; VAN EEDEN et al., 2003).

Levantamentos em território brasileiro evidenciam o acometimento de 36 mil novos casos anuais. A incidência anual é 0,7% em pessoas com DP no intervalo de 60 a 69 anos e de 1,5%, entre 70 a 79 anos (IBGE, 2018). Peternella e Marcon (2009) destacam a prevalência de 3,3% em indivíduos acima de 64 anos de idade.

Esses números decorrem do aumento da expectativa de vida, resultando em uma crescente preocupação com a manutenção da saúde da população idosa, sobretudo, diante das doenças crônicas e degenerativas. Em decorrência desta modificação populacional, os sujeitos com mais de 60 anos aumentaram de 8% em 1950 para 11% da população mundial em 2010 (IESS, 2013). Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU), esse percentual poderá atingir 17% em 2030 e 22% em 2050 (ONU, 2017).

Reputa-se que o Brasil detenha 3,3% da população acima de 65 anos. Contudo, dados de 2019, destacam que o número de idosos no Brasil alcançou 32,9 milhões. Assim, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018) aponta que a tendência ao crescimento da expectativa de vida vem permanecendo e que os dados estatísticos de sujeitos superior a 60 anos no país já se assemelhe eminente ao de crianças de 9 anos de idade.

Deste modo, o surgimento de 7,5 milhões de novos idosos no período de 2012 a 2019 evidenciou um acréscimo de 29,5% neste grupo etário. Além disso, estimativas destacam que em 2060, um quarto da população brasileira (25,5%) deverá ter acima de 65 anos, isso significa que o país teria 67,2 indivíduos, com idade inferior à 15 anos e acima dos 65 anos referentes a grupo de 100 indivíduos em idade produtiva (15 a 64 anos) (IBGE, 2018). Efetivamente, a incidência tem aumentado em torno de 1,5% em sujeitos acima de 65 anos, e de 2,5% nos acima de 85 anos de idade (COSTA, 2016; GOBBI et al., 2014; RIEDER et al., 2018).

Informações advindas do Banco Mundial destacam que a expectativa de vida ao nascer suplantou de 52,61 anos em 1960 para 69,63 em 2010, no mundo. Destaca-se que países que apresentam atributos de desenvolvimento, a contingência de vida em 2010 era de 58,84 anos, enquanto nos países desenvolvidos atingiu 79,76 anos. Como resultado desta transição populacional, os indivíduos com mais de sessenta anos passaram de 8% da população mundial em 1950 para 11% em 2010 (IESS, 2013).

Considera-se a Doença Parkinson (DP) uma enfermidade que atinge em grande escala as populações idosas. Trata-se de uma doença 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 oneroso em estágios avançados da doença (OLESEN *et al.*, 2012).

Descrita pela primeira vez por James Parkinson (1755-1824), em 1817, a DP mantém sua definição atualmente. James Parkinson caracterizou movimentos involuntários com força muscular diminuída em membros. Destacou inclinação do tronco anteriormente e alterações no ritmo de caminhada, contudo, com permanência dos sentidos e funções cognitivas (TREVISOLO-BITTENCOURT, TROIANO, COLLARES, 2006).

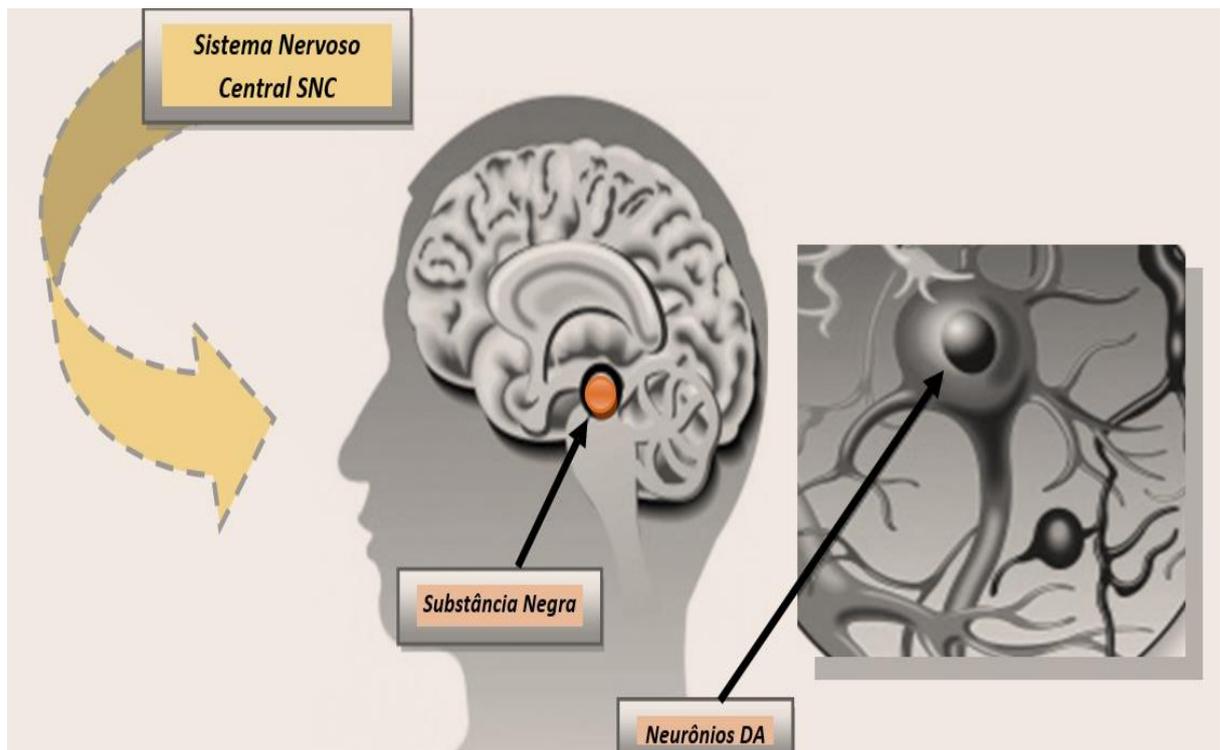
Portanto, a patologia de DP é uma desordem neurológica, crônica, progressiva e polissintomática. A fisiopatologia se caracteriza pelo acúmulo de uma proteína conhecida como alfa-sinucleína e inclusões intraneuronais de corpos de Lewy, responsável por perdas seletivas de populações celulares, como os neurônios dopaminérgicos na via nigroestriada (KLEINER *et al.*, 2015; TOLÖ *et al.*, 2018; KANG *et al.*, 2018). Ocasionalmente uma desordem no sistema extrapiramidal, composto pelos núcleos da base (NB) e o tálamo, no qual diligenciam distúrbios dos movimentos que podem caracterizar hipercinéticos ou hipocinéticos (GALLO; MCISAAC; GARBER, 2014).

Os núcleos da base são corpos de neurônios bem definidos e com funções próprias, situados no interior do centro medular branco do cérebro. Estão implicados de modo direto com o sistema motor, por meio de um encargo modulador dos

movimentos, contribuindo nos procedimentos de delineamento e controle dos movimentos.

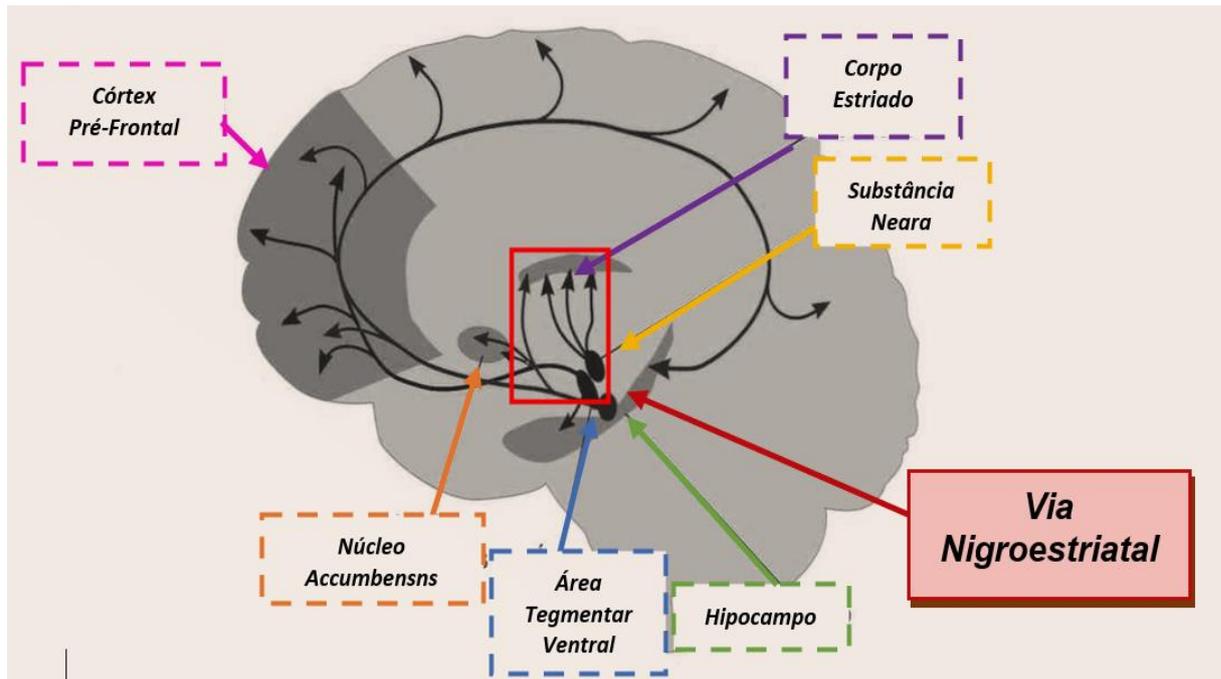
Para os autores Hohlefeld *et al.* (2015) e Paixão *et al.* (2013), a DP é uma patologia neurodegenerativa, de ordem crônica e progressiva do sistema nervoso central (SNC), resultante na degeneração ininterrupta de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNpc) (Figura 1), situada na região da porção superior do tronco encefálico, tendo como consequência a depleção da dopamina (DA) na via nigroestriatal (Figura 2). Estudos mostram que a degeneração na via nigroestriatal também está associada com a diminuição de DA em regiões do cérebro como córtex pré-frontal, as quais recebem projeções dopaminérgicas da área tegumentar ventral (PANG *et al.*, 2019; TAJIRI *et al.*, 2010; YOON *et al.*, 2007).

**Figura 1** - Sistema Nervoso Central: substância negra e Neurônio Dopaminérgico



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

**Figura 2** - Sistema Nervoso Central: via nigroestriatal



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Os basilares sintomas da DP são: tremor em repouso, rigidez, déficits no equilíbrio e na marcha, bradicinesia e redução na amplitude dos movimentos (DI BIASE; FASANO, 2016; TYSNES; STORSTEIN, 2017; WALUSINSKI, 2018). Essas desordens motoras podem ocasionar ao idoso o isolamento e distanciamento social, ausência para realizar as atividades alcançadas anteriormente, além de dependência para a condução da vida diária, perda de autonomia, por conseguinte diminuição de sua qualidade de vida (Figura 3) (MARTINEZ; MARTIN, 2006; FILIPPIN *et al.*, 2014).

Tais sintomas aparecem inicialmente em um dos hemisférios do corpo, evolucionando, seguidamente, para o outro, em conformidade com a evolução da doença (HAWKES *et al.*, 2010; QURESHI *et al.*, 2012). Contudo, cada paciente pode ou não apresentar todos os sintomas, significando que 30% não chegam a exibir o clássico tremor de repouso (OLANOW; STERN; SETHI, 2009).

Os sinais e sintomas motores da DP decorrem das alterações funcionais dos núcleos da base (NB). Assim, a DP foi a primeira patologia 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 (RIEDER *et al.*, 2018).

Além dos sintomas motores, evidências crescentes sugerem que a DP apresenta diversos sintomas não motores como: os neuropsiquiátricos, distúrbios do sono, sintomas autonômicos, sensoriais, alterações emocionais, depressão, déficits cognitivos, impactando significativamente nas atividades funcionais (Figura 3) (KUOPIO *et al.*, 2000; DIBBLE *et al.*, 2009; VAN DEN BOS *et al.*, 2013; LIMA, 2013; MOHANA DEVI *et al.*, 2020; PERLMUTTER, 2014).

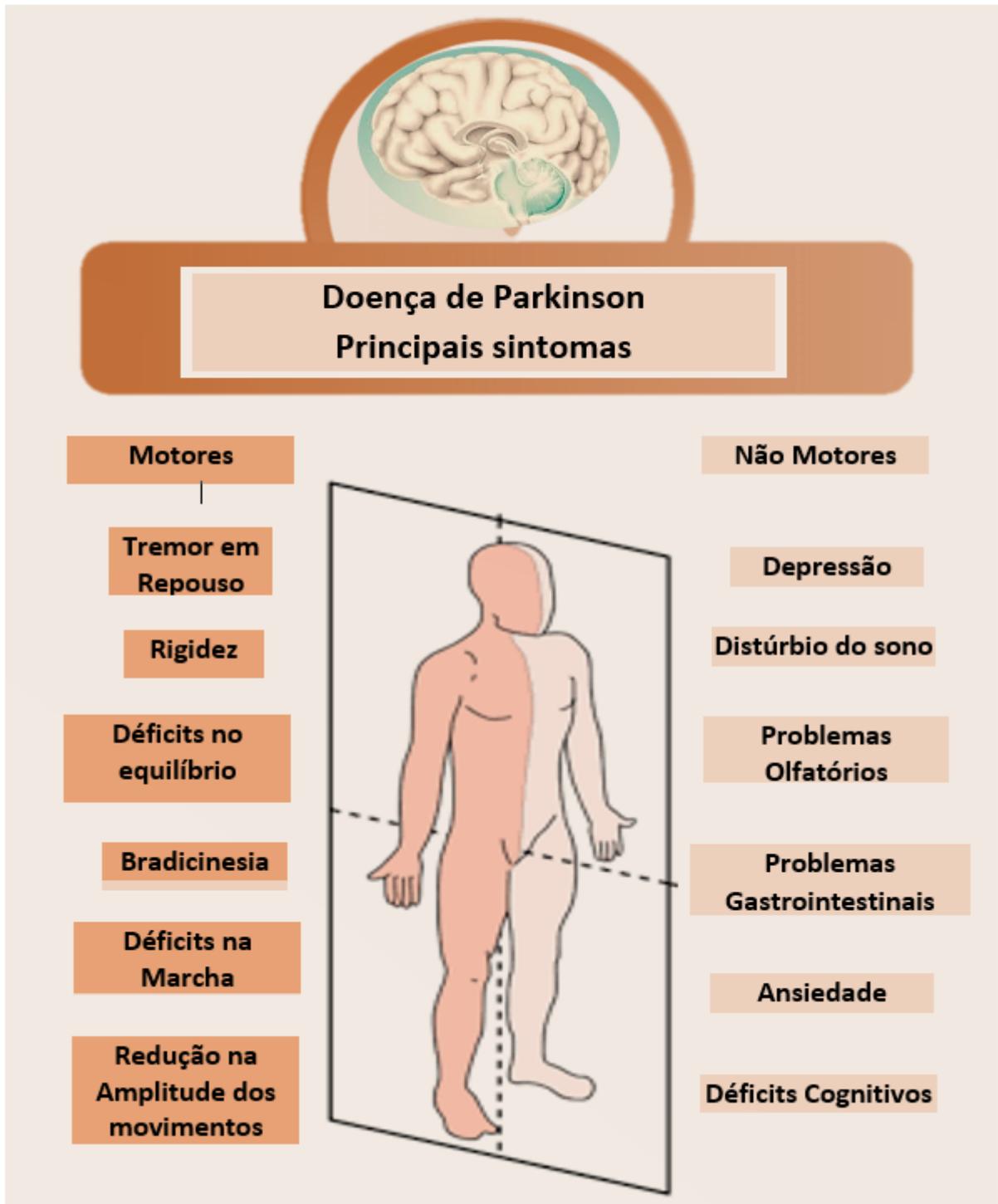
Estudos destacam os sintomas neuropsiquiátricos, distúrbios do sono, sintomas autonômicos e sensoriais (CHAUDHURI *et al.*, 2006), estão associados ao estágio avançado e precoce da patologia, podendo preceder o surgimento de sintomas motores. Tendo em vista esta hipótese, existe uma tendência a novas pesquisas em investigação de fenótipo da fase não motora, preconizando que estes podem ser reputados motivos de ameaça para o progresso da DP, bem como alusivos para o diagnóstico formal (WEINTRAUB; COMELLA; HORN, 2008).

De tal modo, o declínio intelectual e os distúrbios cognitivos ocasionam dificuldades de concentração e de memória para fatos recentes, dificuldades para realização de cálculos, bem como atividades que solicitam orientação espacial podem ser acometidas. Ressalta-se que disfunções cognitivas conseguem ser achadas em quaisquer estágios do desenvolvimento da patologia (KUOPIO *et al.*, 2000; VAN DEN BOS *et al.*, 2013). Nas etapas iniciais e intermediárias, incidem déficits moderados, por conseguinte 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, possivelmente, a uma disfunção das conexões fronto-estriatais (BRANDT *et al.*, 2004).

Os sinais da DP habitualmente têm progressão lenta e a validação do diagnóstico pode ocorrer em meses ou até anos, após o aparecimento dos primeiros sintomas motores. Diversos estudos ressaltam que, quando os sinais motores suplantam o limiar de detecção clínica, uma perda significativa dos níveis de DA estriatais já ocorreu (LEVY; AGELADA; GREENE, 2009; MAYO *et al.*, 2005). Portanto, a ocorrência do processo neurodegenerativo já se encontra num estágio

muito evoluído quando o diagnóstico é constituído e pode ser responsável pela baixa eficiência do tratamento farmacológico.

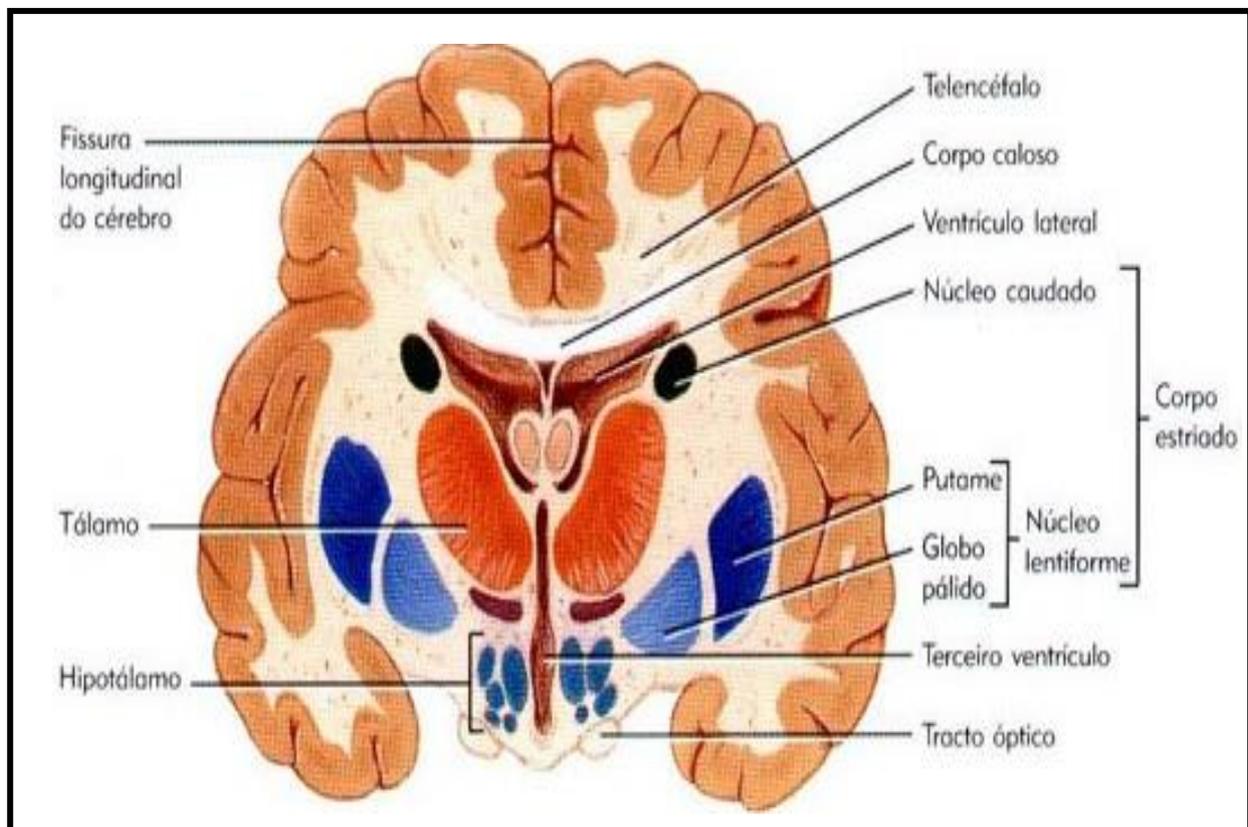
**Figura 3 – Sintomas motores e não motores da Doença de Parkinson**



Fonte: Elaborado pelo autor, 2022.

Os NB são compostos por uma complexa rede de núcleos e vias nervosas. Participam do planejamento de movimentos voluntários, encontrando-se implicados no controle das funcionalidades cognitivas e afetivas. Constituem os NB o corpo estriado (CE) - núcleos caudados 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 (NST) (Figura 4) (GALVAN, 2008; KANDEL *et al.*, 2012; GOBBI *et al.*, 2014).

**Figura 4** – Estrutura e localização dos Núcleos da Base (NB)

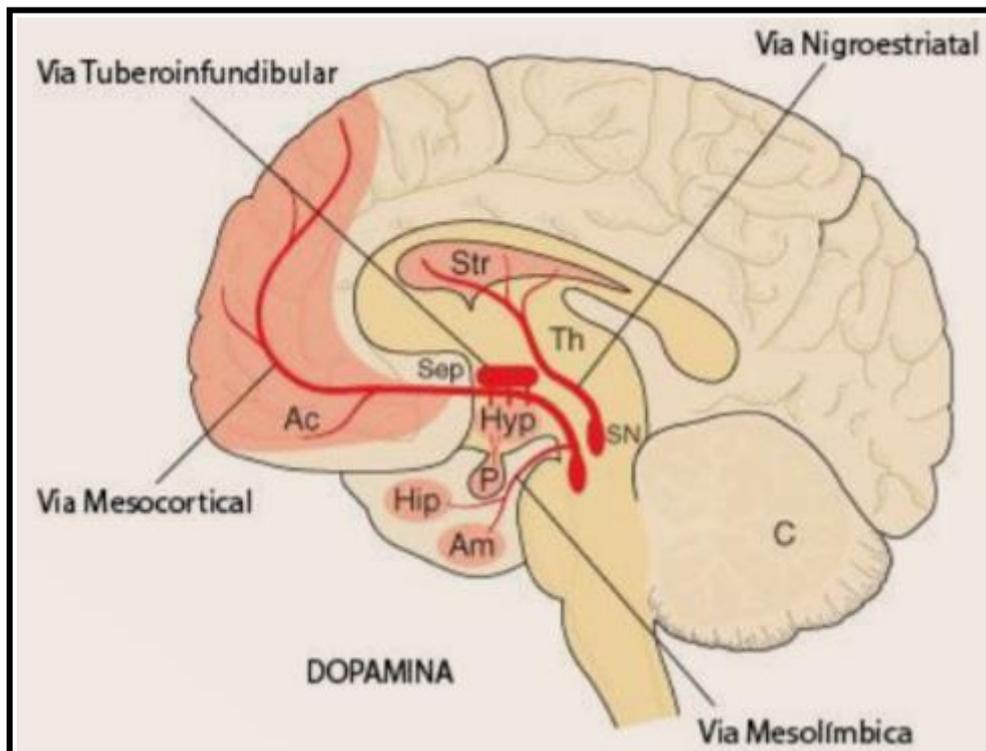


Fonte: <http://bio-neuro-psicologia.usuarios.rdc.puc-rio.br/n%C3%BAcleos-basais.html>

A SN é composta por uma área rica em pigmentos, denominada *pars reticulata*. Os neurônios da SNpc são responsáveis pela produção da dopamina, enquanto 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: Nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular (Figura 5) (AGUIAR, 2009).

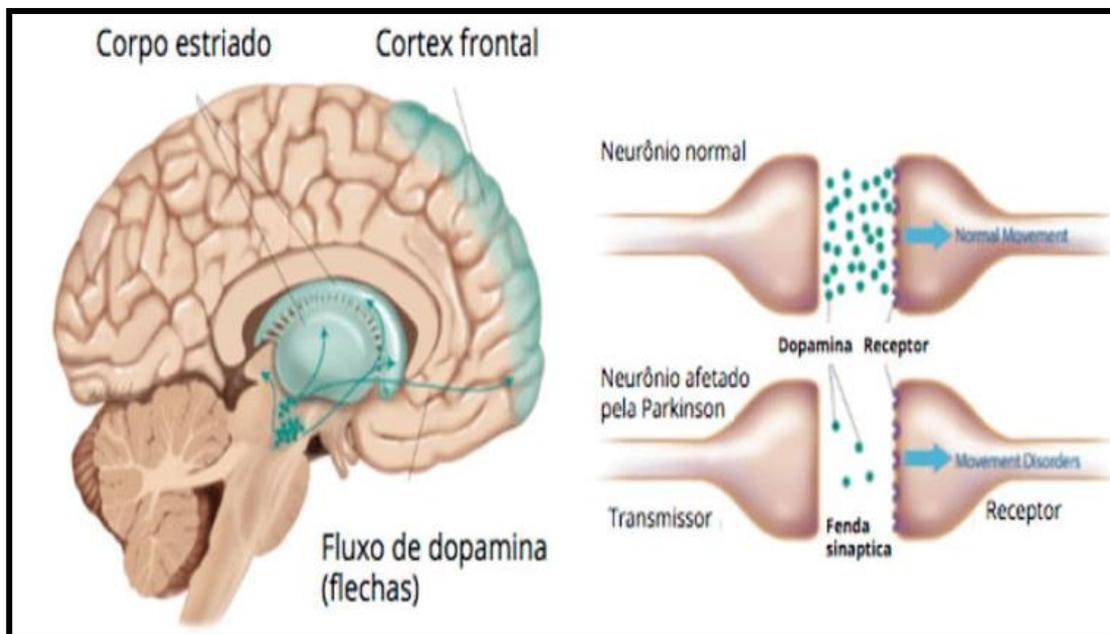
**Figura 5** - Representação dos sistemas dopaminérgicos: nigroestriatal, mesolímbico, mesocortical e tuberoinfundibular



As vias dopaminérgicas. Ac (núcleo acumbens); Am (Núcleo Amigdalóide); C (Cerebelo); Hip (hipotálamo); Hyp (hipotalamo); P (hipófise); Sep (septo); SN (*substantia nigra*); STr (estriado); Th (tálamo). Fonte: Adaptado de Rang et al., 2015.

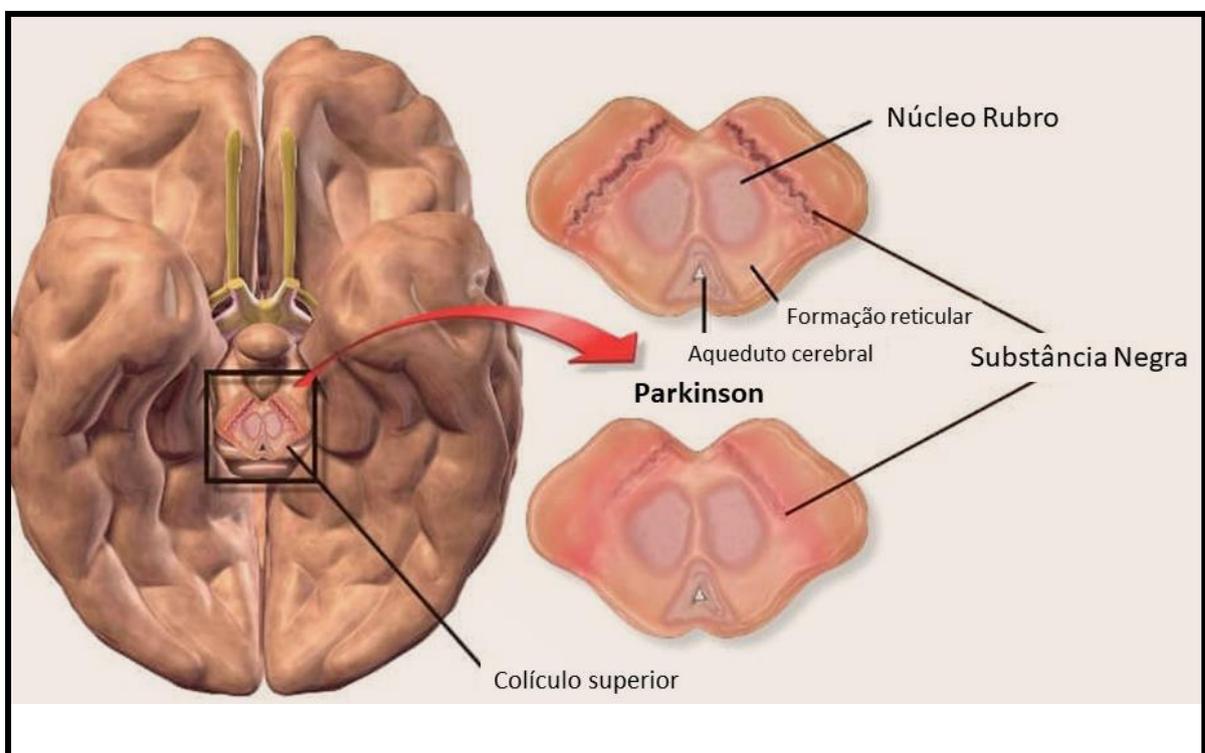
As projeções que constituem a via dopaminérgica nigroestriatal surgem de células da SNpc, cujos axônios terminam no corpo estriado, onde ocorre a liberação de DA (Figura 6). DP apresenta efeitos opostos nas células, sendo excitatórios nas células da via direta e inibitórios nas células da via indireta (OBESO *et al.*, 2008). Em síntese, a DA tem uma atuação modeladora nos NB, visto que, quando liberada no CE, proporciona o movimento. Tal fato elucidada a demora de movimentos e a rigidez na musculatura na DP, uma vez que a degeneração dos neurônios nigroestriatais causa a redução da concentração de DA no corpo estriado, por conseguinte, distúrbios de movimento (Figura 7) (OBESO *et al.*, 2008; STOCCHI, 2009).

**Figura 6 - Corpo Estriado (CE) e liberação de dopamina (DA)**



Fonte: <http://homecisneazul.com.br/post.php?id=74>

**Figura 7 - Ausência da Substância Negra na Doença de Parkinson**



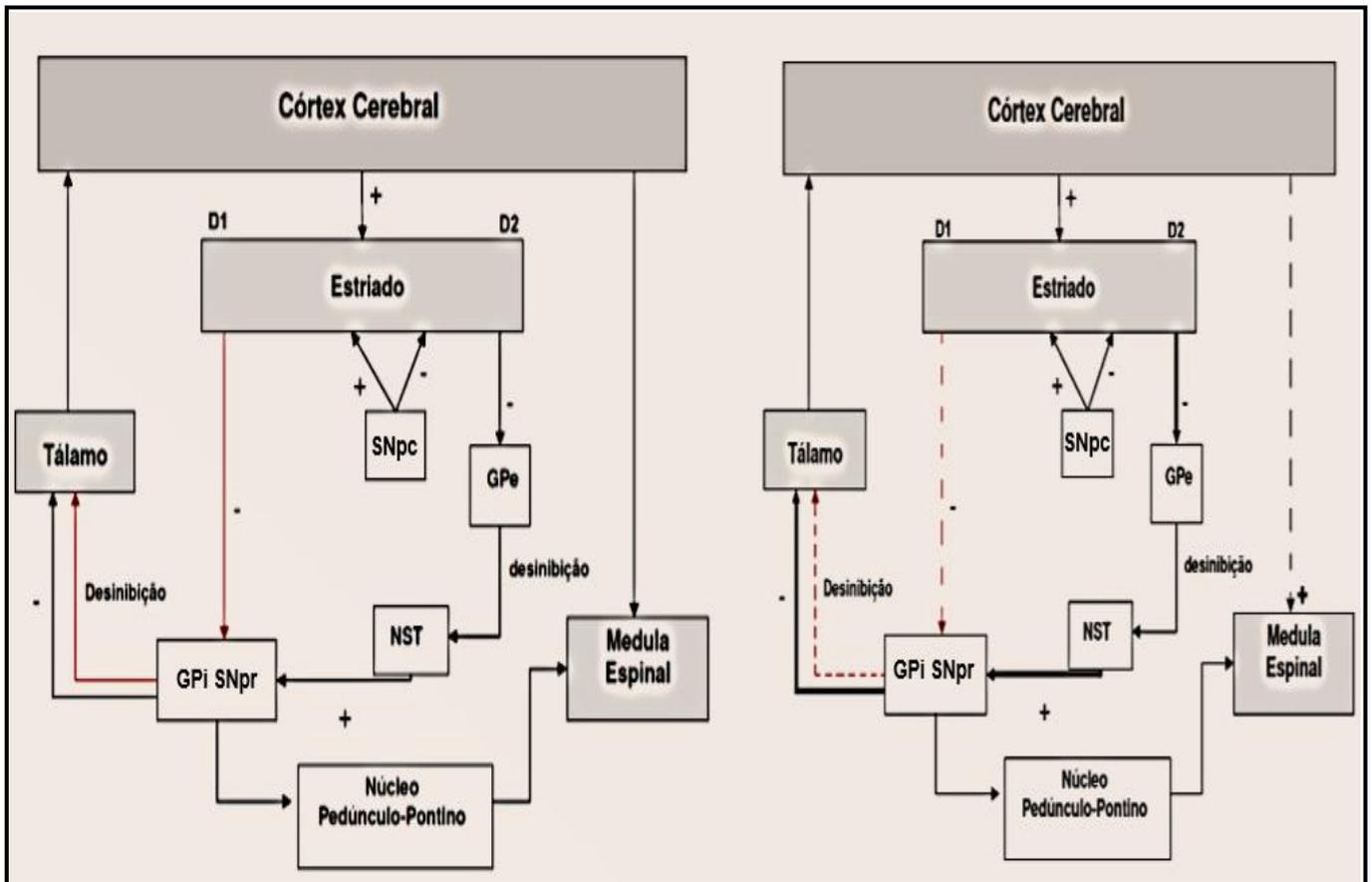
Fonte: <https://sites.google.com/site/implantesparkinson/introducao>

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

A atenuação de DA no CE expõe ainda como implicação a redução dos níveis de seus metabólitos, ácido homovanílico (HVA) e 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (LANG; LOZANO, 1998). Ressalta-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). Contudo, a neuropatologia da DP não está limitada excepcionalmente à via nigroestriatal, de forma que são advertidas anomalias histológicas em diferentes grupos celulares dopaminérgicos e não dopaminérgicos. Acredita-se que outros neurotransmissores, sobretudo noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e acetilcolina (ACh), estejam adjuntas ao extenso espectro de sintomas motores e não motores nos pacientes com DP (AGUIAR JUNIOR, 2011; TADAIESKY, 2010).

Deste feito, o controle da atividade dos núcleos da base está de modo direto conexo à expressão diferencial dos receptores D1 e D2 responsáveis pela ativação das diferentes vias e, assim, promovendo respostas distintas nos núcleos talâmicos ventrolateral e centro-mediano (BLANDINI *et al.*, 2000). Os níveis acrescidos de DA no estriado tende a ativar neurônios que expressam D1 na via direta, enquanto suprime os neurônios da via indireta que expressam D2 (OBESO *et al.*, 2000) Por conseguinte, fica manifesto a magnitude do sistema dopaminérgico na adequada performance dos núcleos da base (Figura 8).

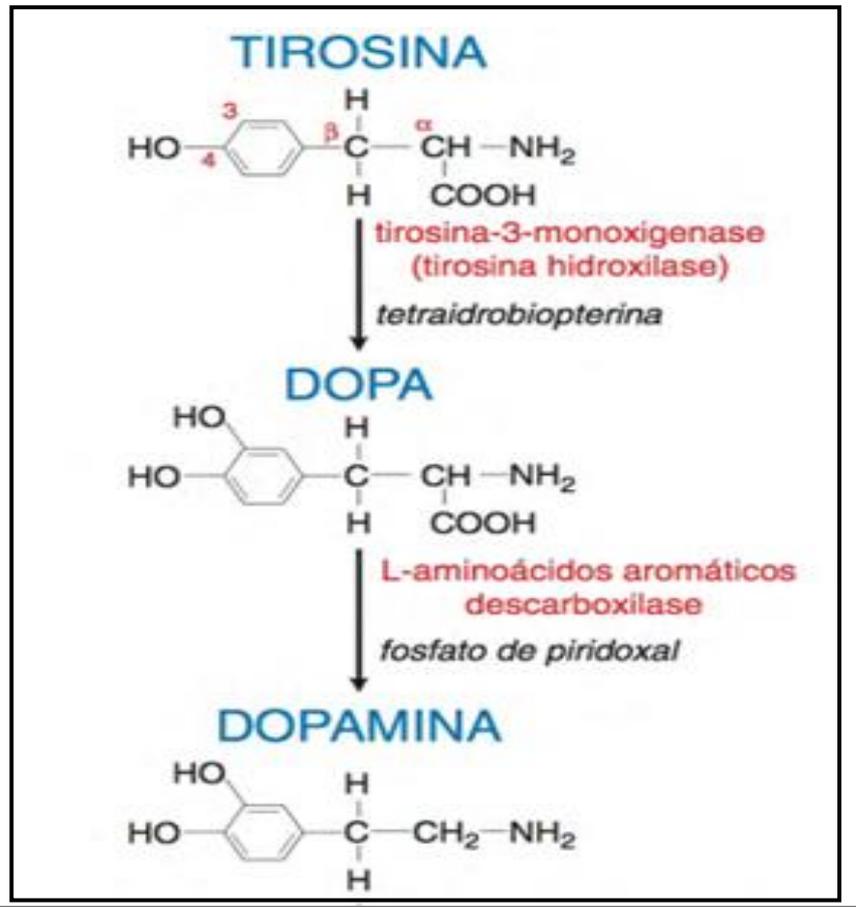
**Figura 8** - Circuito do Núcleo da Base normal (A); Circuito do Núcleo da Base Doença de Parkinson (B)



O globo pálido interno (GPi) e globo pálido externo (GPe), a substância negra a parte reticular (SNpr) e compacta (SNpc) e núcleo subtalâmico (NST). Imagem (A) as setas vermelhas concebem a via direta do estriado e as pretas a via indireta. A via direta promove desinibição do tálamo, enquanto a indireta promove inibição. Imagem (B) as setas vermelhas simulam a via direta do estriado e as pretas a via indireta. As linhas tracejadas concebem os circuitos que se encontram afetados na DP, e as linhas mais grossas os circuitos que se apresentam com a atividade exacerbada. Assim, o resultado consiste em uma inibição excessiva do tálamo e de tal modo há prejuízo do movimento motor. Fonte: Modificado de Alexander e Crutcher (1990).

Assim, a síntese de DA incide na conversão do aminoácido tirosina em L-DOPA pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH), na compleição do cofator obrigatório tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), continuada da atuação da descarboxilase de aminoácidos aromáticos para em seguida ser convertida a DA e armazenada em vesículas sinápticas (Figura 9) (FAHN, SULZER, 2004; TRIMMER *et al.*, 2009; ROUSSEAU *et al.*, 2012).

**Figura 9** - Via de produção da dopamina



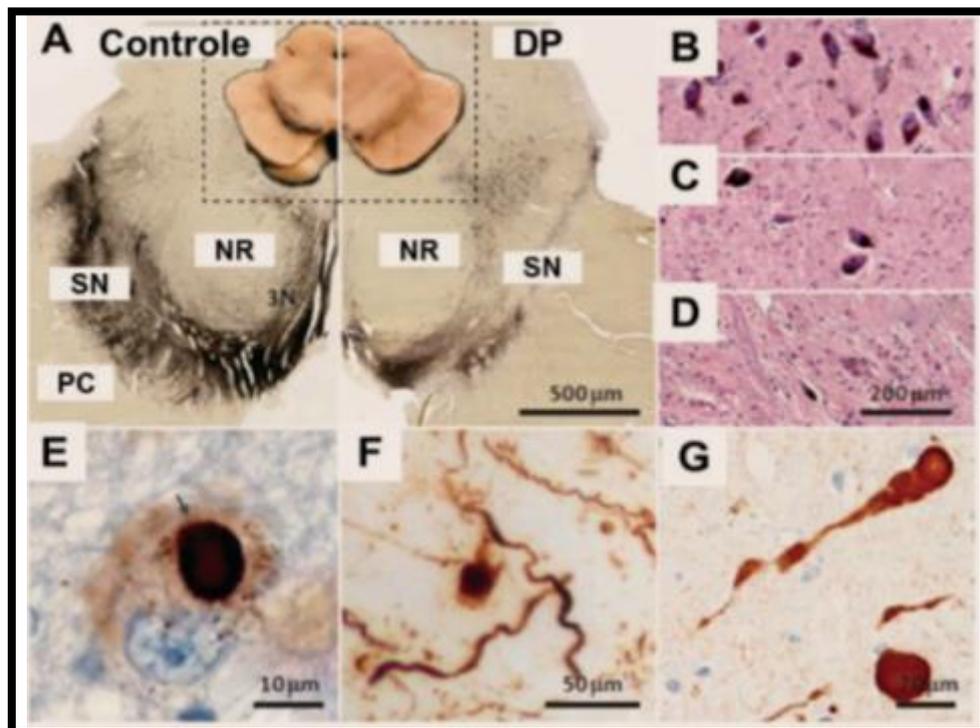
Fonte: <https://medium.com/mundo-molecular/neurotransmissores-e-receptores-adren%C3%A9rgicos-ef52d64a4376>

## 1.2 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

São vários os fatores de risco para o desenvolvimento da doença de DP. Devido sua complexidade, reconhece a patologia como multifatorial, podendo incidir questões genéticas e ambientais enunciados em diferentes trabalhos como: a alimentação (ANDERSON *et al.*, 1999), a exposição a pesticidas, herbicidas, produtos químicos industriais, alguns metais, solventes orgânicos e monóxido de carbono (TANNER; GOLDMAN, 1996; GORELL *et al.*, 1997), o tabagismo, o álcool, a exposição à VD e os elevados níveis de ureia (KALIA; LANG 2015). Diferentes autores estudam o tipo de ocupação, designadamente o ambiente rural (GORELL *et al.*, 1997) como fator de risco associado a DP (BALL *et al.*, 2019).

Contudo, os mecanismos fisiopatológicos da DP não estão decisivamente determinados. Os achados anatomopatológicos envolvendo grupos celulares específicos, os quais compõem um conjunto de estruturas de substância cinzenta cerebral chamadas de gânglios da base, estão absolutamente conectados a sintomatologia da doença (CAMPOS, 2010) (Figura 9). Deste modo, características basilares da fisiopatológica da DP são a progressiva degeneração dos neurônios mielinizados da parte compacta da substância negra (SNpc) e o surgimento de inclusões citoplasmáticas, denominadas como corpúsculos de Lewy, sendo constituídas sobretudo por alfa-sinucleína e ubiquitina (Figura 10) (EMBORG, 2004; PROTTER *et al.*, 2012; TOLÖ *et al.*, 2018; VILLEGAS PEDRAZA *et al.*, 2014).

**Figura 10** - As principais alterações neuropatológicas observadas na doença de Parkinson (DP)



Legenda: Imagens do mesencéfalo após coloração imunohistoquímica para tirosina hidroxilase, enzima limitante na síntese de catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina). A DP é caracterizada pela despigmentação da substância negra (SN) (parte direita) comparado com o controle (parte esquerda) (A). A técnica de coloração com hematoxilina e eosina indica uma distribuição normal de neurônios pigmentados em um indivíduo controle saudável (parte B), bem como a perda seletiva de corpos celulares de neurônios da SN em estágios moderados (parte C) ou avançados (parte D) da DP. A marcação com imunohistoquímica da  $\alpha$ -sinucleína mostra a presença de Corpos de Lewy (E), depósitos granulares mais difusos de alfa-sinucleína (F) e esferóides  $\alpha$ -sinucleína (G). Fonte: Adaptado de POEWE *et al.*, 2017.

O processo neurodegenerativo da SNpc envolvida na DP é apontado pela ausência de TH e aparecimento de inclusões intracitoplasmáticas ricas em corpos de Lewy (BRÁS *et al.*, 2020). O dano neuronal dopaminérgico se inicia na camada ventro lateral da substância negra, prosseguindo para as camadas, medial, ventral e dorsal. Esse padrão de detrimento está pertinente à redução de transportadores de DA (PEREIRA *et al.*, 2007).

Tais acontecimentos de morte neuronal são provocados por inúmeros intentos que induzem a um panorama de entendimento limitado. Contudo, um dos achados fisiopatológicos mais constantes na DP é a de inclusões citoplasmáticas nucleares chamadas de corpúsculos de Lewy (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; TOGO *et al.*, 2001), constituídos, especialmente, pela proteína neural alfa-sinucleína (KOO; LEE; IM, 2008; TAKAHASHI; WAKABAYASHI, 2001; WEINTTRAUB; COMELLA; HORN, 2008). Esses associados proteicos se condensam nos neurônios, onde, ao suplantarem um estipulado limiar, ocasionam neurotoxicidade conseqüentemente morte neuronal e simultâneo arrefecimento da aferência dopaminérgica para o CE (Figura 9).

Conseqüentemente, a alteração gradual da via nigroestriatal é o regulador hegemônico para as demonstrações clínicas da DP, incluindo rigidez muscular, tipo plástica, tremor de repouso, bradicinesias, que se elucidam por lentidão dos movimentos e dificuldade em dar início aos movimentos voluntários, e instabilidade postural por detrimento de reflexos posturais, sendo capaz de exibir disfunções não motoras (FERNANDEZ, 2012; GUERRERO *et al.*, 2013; JANKOVIC, 2008; MOSLEY *et al.*, 2006).

Apesar dos avanços da medicina e da averiguação científica neste campo, a etiologia da DP permanece ainda por elucidar, a multiplicidade dos casos exibe etiologias multifatoriais, com a compleição de artifícios genéticos e ambientais como, por exemplo, a exposição crônica a alguns tipos de herbicidas e pesticidas (SULZER, 2007; PROTTER *et al.*, 2012). Evidências incidem que aceitáveis mecanismos como, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, carência de fatores neurotróficos, atuação do sistema imune, acumulação de proteínas alteradas, excitotoxicidade e mecanismo pró-apoptótico estejam seguramente alistados à etiologia da DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; GOBBI *et al.*, 2014; SCHAPIRA, 2010; TAMILSELVAM *et al.*, 2013; TUON *et al.*, 2015).

### 1.3 Estresse Oxidativo na Doença de Parkinson

O estresse oxidativo tem sido debatido como um relevante colaborador na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas (SAYRE *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009). Diferentes estudos buscam entender o papel do estresse oxidativo nos distúrbios neurodegenerativos, já que, nestas situações, constata-se o acréscimo na formação de EROs (FLOYD, 1999; LEE *et al.*, 2009; PHANI *et al.*, 2012). De tal modo, o estresse oxidativo tem sido amplamente reconhecido como um relevante mecanismo final de morte celular em inúmeras desordens degenerativas, abrangendo a DP (SCHAPIRA; JENNER, 2011).

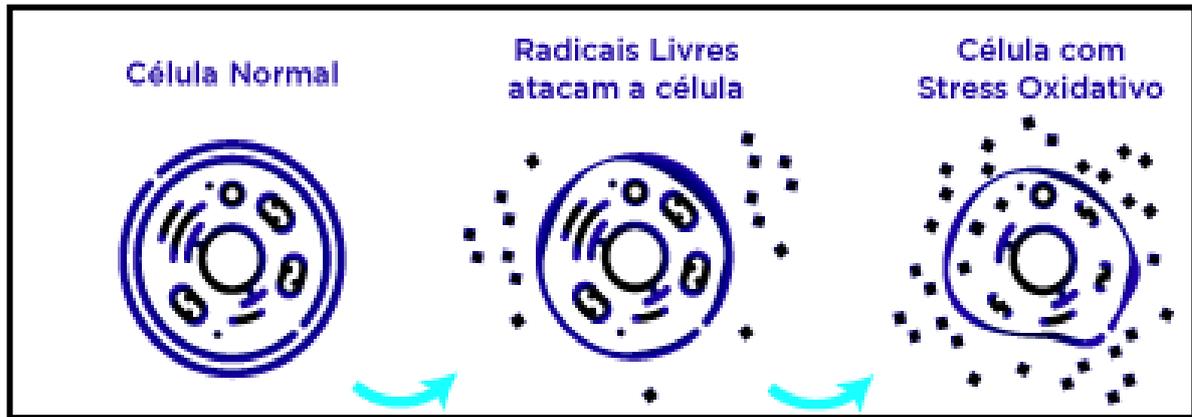
Os radicais livres são moléculas demasiadamente reativas, instituídas com base de transferências de elétrons e produzidas durante o metabolismo celular (VALKO *et al.*, 2007). Desta maneira, conseguem responder e formar diferentes séries de espécies reativas, como as espécies reativas do oxigênio (EROs) e, se não neutralizadas, têm potencial de ocasionar o estresse oxidativo, acentuar a inflamação e propiciar dano tecidual, ou seja, o estresse oxidativo acontece em uma condição de desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos antioxidantes (BLESA *et al.*, 2015).

Portanto, o dano oxidativo advém nos organismos celulares em virtude do desequilíbrio em meio à produção dos radicais livres e as defesas antioxidantes celulares. No decurso da respiração celular habitual ou da respiração mitocondrial desregulada com um desequilíbrio no complexo I mitocondrial, quantidades elevadas de EROs são capazes de serem produzidas e provocarem implicações deletérias no delicado equilíbrio neuronal do SNC, que é notadamente sensível a episódios causadores de estresse oxidativo, devido suas características fisiológicas e anatômicas (BRAGA, 2008).

Regularmente, as EROs são decompostas e eliminadas pelos sistemas de defesa celular, permanecendo, 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, a decorrência é um excesso de EROs, que induz a uma situação denominada de estresse oxidativo (THAKUR; NEHRU, 2014), podendo ocasionar uma ruptura de membranas lipídicas e a

oxidação de proteínas citoplasmáticas (Figura 11) (BUTTERFIELD; BADER LANGE; SULTANA, 2010).

**Figura 11** - Estresse Oxidativo na Célula



Fonte: <https://clinicaconceitosaude.com.br/observatorio-internacional-de-estresse-oxidativo/>

Destaca-se que o estresse oxidativo influencia na ativação de caspases, em consequência apoptose na DP (FRIEDLANDER *et al.*, 2003), bem como podendo originar inflamatórias crônicas, alterando ações em diversas biomoléculas (TUON *et al.*, 2015; SARKAR *et al.*, 2017). Em autópsias de paciente com DP foram encontrados indícios de estresse oxidativo na substância negra do cérebro, apontando que esse apresenta um papel importante na degeneração de neurônios (PRASAD, COL, KUMAR, 1999; PARASKEVAS *et.al.*, 2003). Numerosos estudos em tecidos cerebrais *post-mortem* de pacientes com DP demonstram a compleição de elevados níveis de peroxidação lipídica, depleção de GSH e alta oxidação proteica. Conseqüentemente, reforça-se que EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN) estão envolvidas na degeneração de neurônios dopaminérgicos (MAETZLER *et al.*, 2011; TSANG; CHUNG, 2009).

Para Klein e Ackerman (2003), os neurônios dopaminérgicos na SNpc de cérebros de pacientes com DP expuseram marcadores de estresse oxidativo, como peroxidação lipídica, oxidação de proteína e de ácidos nucléicos e contrafações no sistema de defesa antioxidante. Portanto, a presença de níveis acrescidos de EROs propicia uma neurodegeneração seletiva na DP levando à auto-oxidação da DA (MIYAZAKI *et al.*, 2006).

É sabido que o óxido nítrico (NO) participa de diversas funções do SNC, incluindo indução e manutenção da plasticidade sináptica, liberação de neurotransmissores e remoção de agentes patogênicos (CHEN *et al.*, 2005; DAWSON *et al.*, 1992). Em situações patológicas, tais como doenças neurodegenerativas, podemos encontrar uma grande concentração de NO capaz de causar respostas tóxicas na célula. A neurotoxicidade está associada à formação de peroxinitrito, devido à reação que ocorre entre o radical livre superóxido com o ON (KAVYA *et al.*, 2006).

Tais circunstâncias químicas são abundantes na natureza, compostas regulamente no metabolismo celular e encontradas no meio ambiente, prontamente formadas com exposição intensa à luz solar, poluição, álcool, inseticidas, radiação, exercício intenso, etc. Apesar disso, existem enzimas antioxidantes protetoras e mecanismos que neutralizam os radicais livres, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutatona, glutatona peroxidase (GPx) e redutase (GSH), a vitamina E, a vitamina C, vitamina D e diferentes substâncias adequadas para inativar ou atenuar o desenvolvimento dos radicais livres (MOSLEY *et al.*, 2006).

Os mecanismos de defesas antioxidantes são demasiadamente complexos na DP. Os múltiplos sistemas conseguem operar particularmente ou sinergicamente entre si para regular o sistema redox do cérebro. Dentre esses sistemas, o sistema glutatona tem chamado atenção em diversos estudos na DP (SMEYNE *et al.*, 2013). A glutatona é um antioxidante hidrossolúvel e identificado como o tiol não proteico mais relevante em sistemas biológicos, devido seu envolvimento na regulação do estado redox celular, especialmente por ajustar os níveis de peróxido de hidrogênio do espaço intracelular. Desde 1989 que o nível de glutatona vem sendo correlacionado à baixa regulação oxidativa na DP, pois seus níveis são reduzidos na substância negra de parkinsonianos (RIEDERER *et al.*, 1989, MAETZLERET *et al.*, 2011).

#### **1.4 Tratamento da Doença de Parkinson**

O caráter progressivo da DP e suas condições clínicas, tanto as motoras como as não-motoras, tornam o tratamento farmacológico desafiador (MORRISH *et al.*, 1998). Sabe-se que os avanços nas alterações neuropatológicas da DP e suas

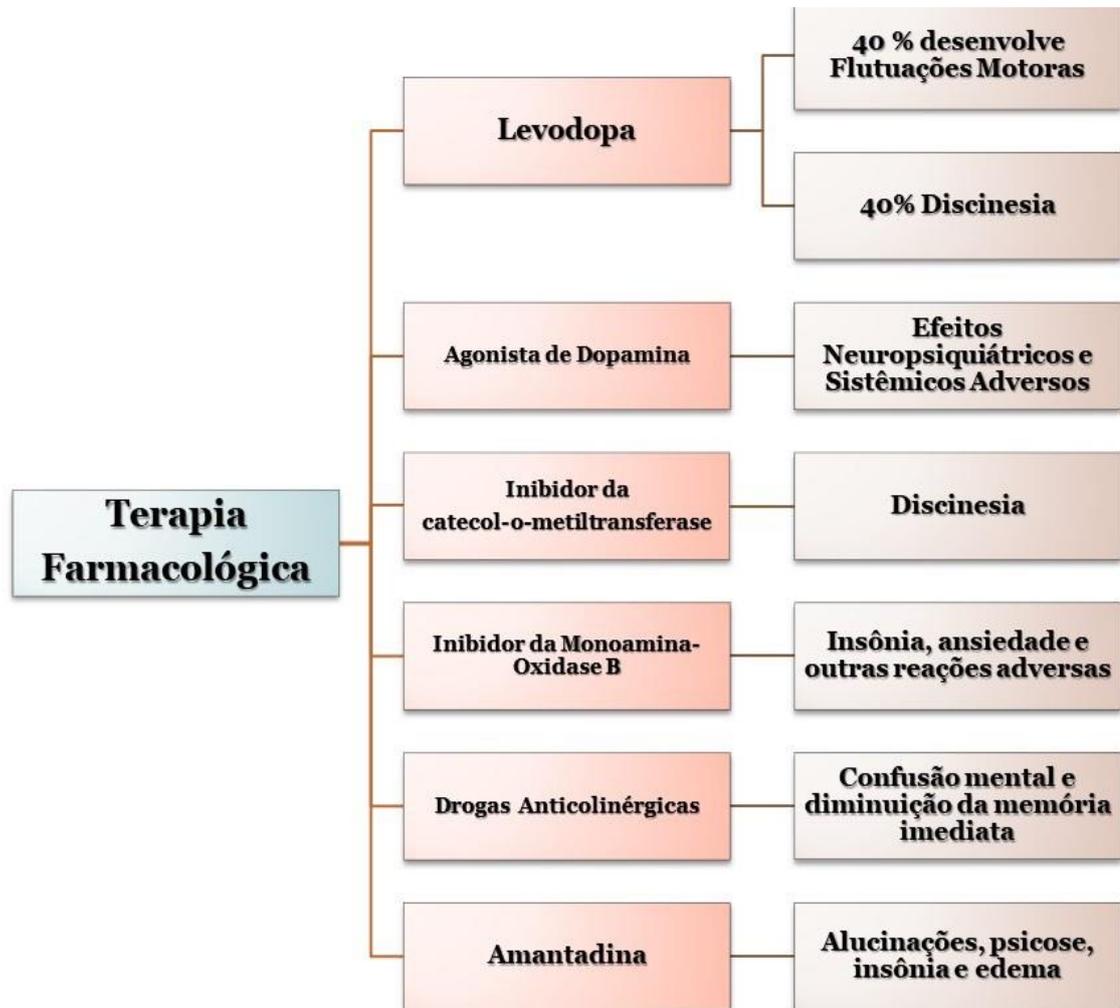
diferentes sintomatologias atenuam a resposta, as terapias medicamentosas (MORRISH et al., 1998).

Contudo, o tratamento disponível até o momento se encontra em uma condição de auxílio sintomático porque ainda não existem agentes capazes de inibir a degeneração neuronal. À medida que a doença progride, os medicamentos perdem sua eficácia e eficiência, sendo imprescindível uma ampliação das doses e a substituição ou a associação terapêutica para reduzir os efeitos causados pela doença. Outro fator limitante relacionado ao tratamento atual são os efeitos adversos dos medicamentos, 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; antilutamatérgicos (amantadina) e antagonistas colinérgicos (benztropina) (Figura 12) (AGUIAR, 2009).

O tratamento atual para a DP consiste essencialmente na reposição do precursor da dopamina (levodopa), inibição de sua degradação ou o uso de agonistas dopaminérgicos. A L-Dopa é a droga mais efetiva no tratamento da DP, sendo reconhecida como “padrão ouro” (NAGATSUA; SAWADAB, 2009; NEVES, 2014). Apesar disso, com a continuidade da doença, ressalta-se ocorre uma diminuição da efetividade, bem como sintomas incapacitantes não responsivos ao tratamento (EMBORG et al., 2004).

**Figura 12 – Tratamento farmacológico e efeitos colaterais na DP**



Fonte: Esquema elaborado pelo autor de acordo com pesquisa de JAIN; BENKO; SAFRANEK, 2012; FOX *et al.*, 2011.

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, consistir em 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 L-Dopa é altamente efetiva durante os primeiros estágios do tratamento. No entanto, quando prolongado, os pacientes passam a apresentar flutuações clínicas mais comuns como o fenômeno de “*wearing-off*”, que representa o encurtamento da resposta, o fenômeno de “*on-off*”, onde o paciente flutua entre os estados “*on*”, no qual ocorre a ação da L-DOPA, e estado “*off*”, onde a L-DOPA para de ter ação. Outra configuração de flutuação altamente comum é o fenômeno de “*freezing*”. Este fenômeno corresponde à incapacidade momentânea de iniciar ou de executar um movimento que pode comprometer a locomoção, a fala e a movimentos das mãos (JENNER, 2013; LEWITT; FAHN, 2016).

Kalinderi *et al.*, (2011) destacam que quando prolongado o tratamento com este fármaco, 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 um efeito adverso grave caracterizada por movimentos involuntários que atingem aproximadamente 50% dos pacientes (normalmente após 3-5 anos).

Contudo, as reduções nas doses de L-Dopa podem induzir a movimentos distônicos na região axial, bem como nas extremidades, acompanhados de dor no segmento afetado (HOLLOWAY *et al.*, 2004; JENNER, 2005; RODRIGUES; CAMPOS, 2006). As terapias ainda se apresentam limitadas para o tratamento de DP. Drogas neuroprotetoras estão, recentemente, sendo analisadas com o desígnio de tornar a progressão da doença mais lenta. Múltiplas drogas que apresentam como alvos, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação são aspirantes imprescindíveis como neuroprotetores (SEIDI; POTASHKIN, 2011).

Deste modo, é primordial o investimento para o desenvolvimento de novos tratamentos e terapias que melhorem a sintomatologia da DP com implicações colaterais diminuídas. Espera-se que o tratamento satisfatório deverá congrega a terapêutica convencional às drogas que impeçam o desenvolvimento e avanço da patologia, como os neuroprotetores (AGUIAR, L., 2009). É sabido que as estratégias neuroprotetoras têm sido propostas à medida que o entendimento dos mecanismos moleculares, implicados na patogênese da DP, é elucidado.

### 1.5 Modelo experimental 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA)

Os processos para o entendimento patológico da DP, bem como para avaliação de possíveis alvos, prósperos para a intervenção terapêutica, têm como indispensáveis a utilização dos modelos experimentais. Assim, os modelos empregados estão fundamentados na administração sistêmica ou intracerebral de neurotoxinas com capacidade de replicar peculiaridades patológicas e fenotípicas da doença (BLANDINI; ARMENTERO, 2012).

Os avanços alcançados na atualidade pelos cientistas na terapêutica, assim como a abrangência da fisiopatologia da DP, tornaram-se plausíveis pelo emprego de modelos animais (NEVES, 2014). Os modelos animais, por caracterização, conjecturam os predicados das patologias recorrentes no homem, reproduzindo as alterações da doença, histológicas e bioquímicas, bem como disfunções e alterações funcionais (GERLACH; RIEDERER, 1996; DECRESSAC *et al.*, 2012).

É sabido que os modelos experimentais para DP ainda apresentam limitações em caracterizar os atributos agregados ao contexto clínico, dentre os quais podemos destacar: detecção das alterações motoras associadas; perda gradual dos neurônios dopaminérgicos no transcurso da idade; produção de inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy) (SHIMOHAMA *et al.*, 2003). Contudo, foram desenvolvidos modelos animais através da administração de agentes neurotóxicos que interrompem ou destroem seletivamente o sistema catecolaminérgico, tais como a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA).

A 6-OHDA agente neurotóxico agregado ao modelo de Parkinson, possuindo grande semelhança estrutural com catecolaminas, sendo, dessa maneira, tóxica aos neurônios catecolaminérgicos (BREESE; TRAYLOR, 1971). É uma droga seletiva para células catecolaminérgicas (UNGERSTEDT, 1968), estabelecendo um modelo que suscita uma resposta inflamatória (BLANDINI *et al.*, 2008). A 6-OHDA é bastante útil para pesquisa de mecanismos e possíveis terapias farmacológicas.

Nessa perspectiva, a injeção de 6-OHDA na porção centro-lateral do caudado-putâmen (CPu) é o modelo experimental que proporciona uma proximidade na sintomatologia encontrada em humanos (TILLERSON *et al.*, 2002), especialmente em lesões que acontecem de forma bilateral (DEUMENS *et al.*, 2002; BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008). Contudo, é clássica a lesão

unilateral do sistema nigroestriatal, prevalecer-se neste contexto o lado não lesado do próprio animal como controle das alusões da lesão, bastante aplicada em modelos com ratos (BLANDINI *et al.*, 2007; GRIGOR'IAN, BAZIAN, 2007; SCHWARTING, HUSTON, 1996).

Destaca-se que, quando utilizada a 6-OHDA em modelo animal unilateralmente na via nigroestriatal, apresenta um comportamento estereotipado de rotações contralaterais ao lado lesionado, ocasionado um 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). O que explica esse comportamento é a superexpressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesionada do CE, conhecido como modelo “hemiparkinsoniano” (PERESE *et al.*, 1989).

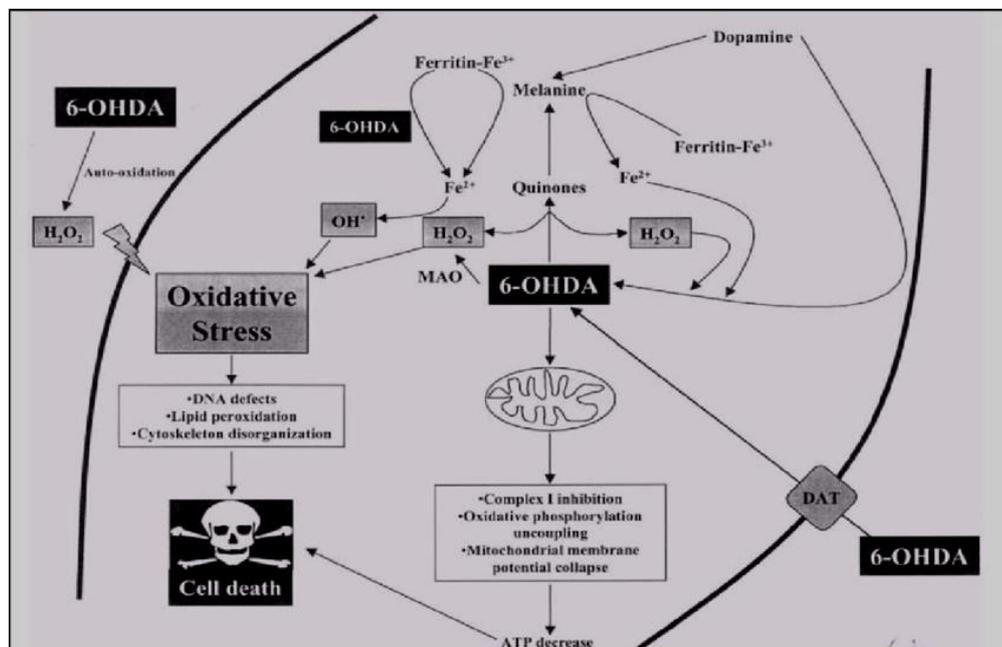
Nesse modelo de rotação, a administração de apomorfina é o teste reconhecido com padrão ouro da literatura para averiguar a estimulação de receptores dopaminérgicos. A apomorfina foi a primeira substância agonista dopaminérgica utilizada na terapia da DP. Ressalta-se que a apomorfina opera nos receptores dopaminérgicos D1 e D2 e, em pequenas doses, atua receptor pré-sináptico, inibindo o *turnover* de DA (DELEU; NORTHWAY; HANSSENS, 2002; LABANDEIRA; GARCIA *et al.*, 1996).

Subsequentemente à injeção na área do cérebro, a neurotoxina é capturada pelas células, ocasionando a produção de radicais livres e disfunções mitocondriais. Situação que acarreta a inibição dos complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial, em sequência o estresse oxidativo (BLUM *et al.*, 2001). Tal ocorrência incide em morte neuronal por meio da ativação de mecanismos apoptóticos condicionados de caspase 3 (TANAKA *et al.*, 2006). A liberação de espécies reativas de oxigênio induz à concepção de quinonas que agem com grupamentos nucleofílicos (Figura 13).

Destaca-se que o estresse oxidativo, ocasionado pela entrada de 6-OHDA na célula, compreende a ampliação das espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas, por sua vez, alteram excitotoxicidade secundária, em razão de acresce os níveis de cálcio livre, tais circunstâncias elevam os níveis de óxido nítrico (ON) intracelular (BLUM *et al.*, 2001; CHIA; TAN; CHAO, 2020).

Os basilares danos neuronais são determinados pelo aumento de EROs no interior do neurônio, ocasionado pela oxidação de 6-OHDA pela enzima MAO e de eventos de auto-oxidação, nos quais os produtos gerados são peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais livres, tipo hidroxila ( $OH\cdot$ ) 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 (SIMOLA; MORELLI, 2007).

**Figura 13 - Mecanismo hipotético de toxicidade 6-OHDA**



O possível mecanismo de toxicidade ocasionado pela 6-OHDA: 6-OHDA pode ocasionar morte celular por três mecanismos basilares: construção de EROs pela auto-oxidação, construção de peróxido de hidrogênio induzida pela atividade da MAO ou inibição direta da cadeia respiratória mitocondrial. Fonte: adaptada de Blum *et al.*, (2001).

A 6-OHDA é uma substância empregue em diversas pesquisas com particularidades em modelos experimentais, em modelos experimentais desenvolvidos em primatas e roedores (DECRESSAC; MATTSSON; BJÖRKLUND, 2012; ANTUNES *et al.*, 2021). No entanto, pode-se apontar outras substâncias químicas como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (GERLACH; RIEDERER, 1996; KAHLE *et al.*, 2002), rotenona e o paraquat que, quando

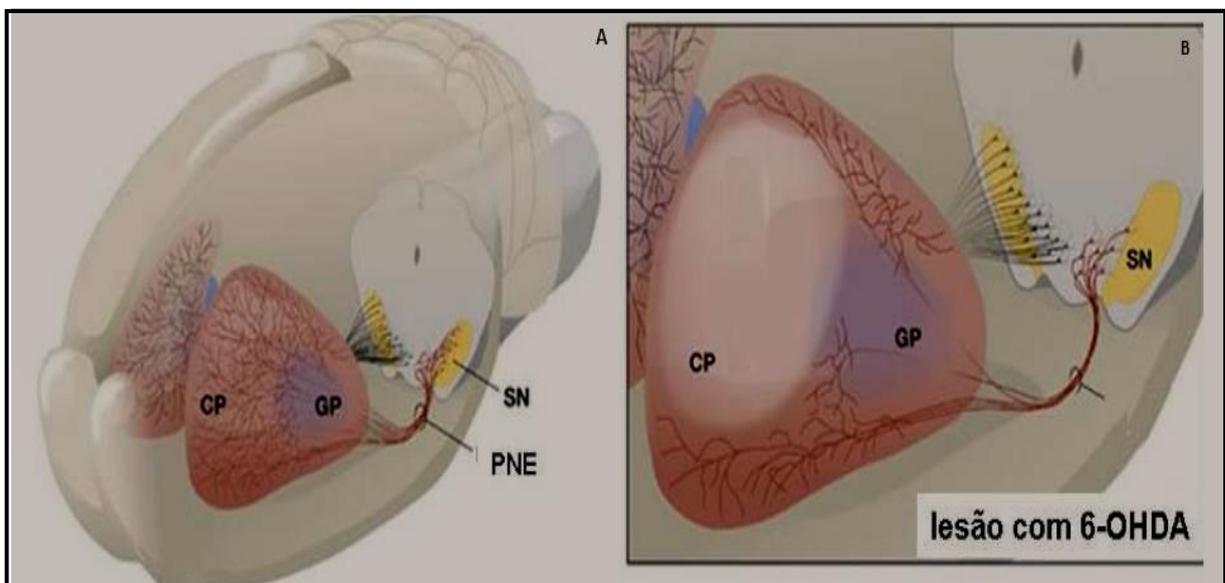
administradas, são capazes de ocasionar determinadas particularidades da DP (SPIVEY, 2011; BETARBET *et al.*, 2002; HALBACH; SCHOBBER; KRIEGLSTEIN, 2004).

Embora o preciso mecanismo subjacente à toxicidade da 6-OHDA ainda esteja sob investigação, o entendimento atual é que a 6-OHDA inicia a degeneração neuronal através da combinação de estresse oxidativo e disfunção da cadeia respiratória mitocondrial (DUTY; JENNER, 2011).

A magnitude da lesão é dependente da quantidade de 6-OHDA injetada e do local da aplicação. Outro fato a ser destacado é que a 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica, sendo necessária a administração diretamente na SNpc, feixe medial do prosencéfalo ou CE, por meio de cirurgia estereotáxica (BLANDINI *et al.*, 2008; ZENG; GENG; JIA, 2018).

A injeção intracerebral de 6-OHDA pode acontecer da seguinte forma: diretamente na SN, induzindo a uma morte acelerada das células (um a três dias) ou mediante injeção no CE, que acarreta degeneração retrógrada dos neurônios da SN. O segundo modelo se caracteriza por acometer uma lesão lenta, parcial e gradual das células neuronais, em um tempo de quatro semanas (Figura 14) (SHIMOHAMA *et al.*, 2003). Episódio esse mimetiza à progressão da DP, oportunizando a verificação de novos tratamentos neuroprotetores (GEORGIEVSKA *et al.*, 2002).

**Figura 14** - Esquema mostrando a via nigroestriatal do cérebro de rato



A) Encéfalo de rato não lesionado com as projeções dos neurônios dopaminérgicos saindo da SN em direção ao corpo estriado (ou caudado-putâmen) e globo pálido em ambos os hemisférios. (B) Em seguida, a injúria unilateral ocasionada pela 6-OHDA, o acometimento da diminuição nas projeções nigroestriatais e 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).

## 1.6 Exercício Físico e Doença de Parkinson

Inicialmente, precisamos entender que atividade física e exercício físico apresentam conceitos diferenciados. A atividade física envolve toda e qualquer relação de movimento realizado pela musculatura esquelética, ultrapassando o metabolismo basal, que deriva num substancial acréscimo do consumo energético (BOUCHARD; SHEPHARD, 1994; ACM, 2013). De tal modo, a prática do exercício físico envolve um contexto estruturado, isto é, requer sistematização e repetição (treino) conduzido pelo profissional da área, com cumprimento de critérios como a duração, intensidade, frequência, progressão, complexidade da tarefa, expectativas e motivação dos praticantes (ACSM, 2013; GOMES *et al.*, 2012).

Deste modo, a prática do exercício físico é uma conduta capaz de ativar cascatas moleculares e celulares responsáveis pelo suporte e manutenção da plasticidade cerebral (COTMAN, BERCHTOLD, 2002). Analogicamente, a relação entre exercício físico e saúde vem se concretizando na contemporaneidade. Pesquisa em largo contexto epidemiológico demonstrou que a prática regular de exercício físico está adjunta à promoção da saúde e à profilaxia de doenças (LEANDRO *et al.*, 2007).

Sabe-se que o sedentarismo é problema mundial de saúde, dentre os ensejos que induzem à inatividade, relaciona-se ao desconhecimento sobre como se exercitar, os escopos de cada exercício, obstáculos de alguns grupos populacionais e percepções distorcidas em relação aos benefícios do movimento (DOMINGUES; ARAÚJO; GIGANTE, 2004). Portanto, a prática regular de exercícios físicos oferece um importante fator protetor para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, especialmente relacionadas ao processo de envelhecimento. De forma contrária, a inatividade física e o sedentarismo cooperam para o aparecimento desse tipo de doença (LAMBERTUCCI, 2013).

O exercício físico implica em amplo consumo de adenosina trifosfato (ATP), cuja extensão depende da intensidade do trabalho a ser efetivado (ROBERGS; GHIASVAND; PARKER, 2004). No caso do exercício classificado como aeróbico, advém ampliação do consumo de oxigênio pelos tecidos ( $VO_2$ ), regulado pela capacidade máxima dos sistemas pulmonar e cardiovascular na captação e no transporte do oxigênio ( $VO_{2MÁX}$ ) para os tecidos (McARDLE, KACTH, KACTH, 2016; VISSERS et al., 2013), assim como a utilização para a oxidação de substratos energéticos, como lipídeos e carboidratos (POWERS, HOWLEY, 2014).

A definição da hegemonia metabólica para o provimento de energia mediante a prática do exercício exhibe extraordinária importância para a adequada determinação da atividade. Dessa forma, muitos são os protocolos de avaliação alitrados para detectar a intensidade de transição entre os metabolismos aeróbio e anaeróbio (FERNANDES et al., 2012; FERNANDES FILHO, 2003; GALLO, ZULUAGA, GOBBI, 2013).

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). Portanto, o exercício físico de intensidade leve a moderada surge como estratégia neuroprotetora (TUON *et al.*, 2012). Índícios científicos asseguram as benfeitorias 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).

Os roedores são utilizados nos principais modelos animais para estudo do exercício físico nas funções cerebrais e seus mecanismos. Os principais modelos de atividade física são: respostas a atividades voluntárias como atividades em rodas de correr (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; COSTA, 2016; PLOUGHMAN *et al.*, 2005).

Nesse contexto, atividade física insuficiente, ou sedentarismo, é um relevante fator de risco para diferentes doenças como: obesidade, doenças cardiovasculares,

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 modificações no músculo esquelético, determinados tipos de câncer, além de fator de risco para doenças neurodegenerativas (TREJO *et al.*, 2002; VILLAR-CHEIDA *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, os resultados benéficos do exercício sobre o sistema nervoso central (SNC) têm sido demonstrados, indicando uma ação protetora em oposição a uma multiplicidade de distúrbios psicológicos e neurológicos (HILLMAN; ERICKSON; KRAMER, 2008; VAN PRAAG, 2009). Logo, o exercício físico se mostrou benéfico nos diferentes modelos de patologias do SNC como: Esclerose Múltipla (EM), doença de Huntington (DH), Alzheimer (DA), Epilepsia e Parkinson (DP) (BENEDETTI *et al.*, 2009; KOHL *et al.*, 2007; LAURIN *et al.*, 2001; TILLERSON *et al.*, 2003). Entretanto, ressalta-se que os mecanismos subjacentes a estas implicações benéficas ainda se apresentam insuficientemente compreendidos.

Pesquisas ainda indicam que a prática do exercício físico leva à diminuição o risco de desenvolver a DP (CHEN *et al.*, 2005; LOGROSCINO *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2011), ou ainda, um efeito neuroprotetor sobre os neurônios dopaminérgicos (LAU *et al.*, 2011; PETZINGER *et al.*, 2007; TAJIRI *et al.*, 2010; YOON *et al.*, 2007). Para Morris (2006), exercícios com treinamento repetitivo, ao serem realizados na fase inicial da patologia, proporcionam um controle motor mais próximo do fisiológico e apropriado quando houver maior deterioração nos gânglios da base e na evolução natural da doença.

Os possíveis benefícios do exercício no início da DP se apresentam cada vez mais caracterizados. Acredita-se que ao manter um programa de exercícios logo ao diagnóstico e ao decorrer da doença, os pacientes obterão melhora ou conservação dos sintomas motores a longo prazo. Relatam-se benefícios dos exercícios a curto prazo, particularmente para a marcha, equilíbrio, disfunções motoras, depressão e qualidade de vida dos pacientes. Os principais tipos de exercícios testados são: exercícios aeróbicos, programas de exercícios estruturados e exercícios funcionais. Os resultados expuseram que o receptor de dopamina D2 tem disponibilidade acrescida, melhorando no controle postural de pacientes submetidos a intenso programa de exercícios. Assim, indicam potenciais melhorias na função física e a

probabilidade de delongio do início da manifestação dos sintomas da DP como decorrência do exercício (PAHWA; LYONS, 2014).

Além disso, o exercício aeróbico apresenta um extraordinário papel na melhoria da aprendizagem, na memória de curto e longo prazo em doenças neurodegenerativas, entre elas a DP (CASSILHAS *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2011). Rubert *et al.*, (2006) descrevem que o exercício físico evita o agravamento de uma série de sintomas que dificultam a vida de um indivíduo com DP tais como: o arrefecimento da inaptidão de realizar determinadas tarefas por conta da rigidez muscular e a acinesia, podendo melhorar a coordenação motora afetada pelo tremor parkinsoniano; a recuperação muscular; moderação das disfunções na marcha e no equilíbrio; a atenuação das decorrências da bradicinesia; a conservação da independência funcional e fácil reintegração na sociedade.

O exercício físico na DP apresenta numerosos benefícios sobre o ponto de vista físico (marcha, postura, equilíbrio e capacidades físicas em geral) e na redução de sintomas não motores (fadiga, depressão, melhoria na função cognitiva, efeito neuroprotetor contra a progressão da doença) (CRUISE *et al.*, 2011).

Destaca-se que estudos com modelos animais da DP têm mostrado diversos processos plásticos desencadeados pelo exercício físico, envolvidos com mecanismos de neuroproteção, tais como melhora da angiogênese (AL-JARRAH *et al.*, 2010), incremento de respostas anti-inflamatórias (CADET *et al.*, 2003) e decréscimo das inflamatórias (WU *et al.*, 2011), melhora das funções mitocondriais (LAU *et al.*, 2011), aumento da neurogênese no CPu (TAJIRI *et al.*, 2010) e na SNc (STEINER *et al.*, 2006), e submetidos a protocolos de exercício voluntário em roda (O'DELL *et al.*, 2007), diminuindo os déficits neuroquímicos, aumentando a produção de tirosina-hidroxilase e do DAT, além da melhora do comportamento motor (COSTA, 2016).

O exercício físico de intensidade leve, por 14 dias consecutivos em esteira, também foi capaz de promover efeitos no modelo induzido por injeção intra-estriatal de 6-OHDA, verificando-se diminuição nos déficits de TH e do comportamento rotacional induzido por injeção de apomorfina (YOON *et al.*, 2007; COSTA, 2016).

Também foi possível observar os benefícios do exercício físico em modelo moderado crônico de DP, induzido por administração de MPTP em camundongos

mostrou que exercício em esteira por 18 semanas (1 semana antes de injetar MPTP, 5 semanas durante a administração e 12 semanas depois a inferência completa da DP) foi capaz de atenuar os déficits de neurônios dopaminérgicos (TH), de DA e do DAT, aumentar os níveis de fatores neurotróficos no circuito nigroestriatal (BDNF e GDNF), além de melhorar a função mitocondrial, blindando, assim como, as células de agravos oxidativos ocasionados pela neurotoxina (LAU *et al.*, 2011).

Em exercícios forçados, os animais o executam de acordo com as determinações do pesquisador, que estabelece a velocidade, inclinação e tempo de treinamento que obrigam 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 percorrer em uma velocidade contínua, de acordo com o protocolo de treinamento do exercício (LIGHFOOT *et al.*, 2001).

O exercício esteira é um método comum de treinamento utilizado pelos pesquisadores que investigam adaptações fisiológicas causadas pelo exercício. Este modelo de treino é empregado em atributo ao seu êxito. Além disso, vários animais são capazes treinar sincronicamente e ainda propicia as maiores respostas do metabolismo aeróbio, fato efetivado pelo controle de parâmetros, como a intensidade, tempo e velocidade (KEMI *et al.*, 2002). Este tipo de exercício tem se revelado também capaz de promover mudanças no sistema nervoso e, quando realizado a curto e longo prazo, pode induzir mudanças no córtex sensorio-motor, corpo estriado e cerebelo (KIM *et al.*, 2010).

A realização da prática regular do exercício físico reduz as implicações induzidas pelas desordens neurodegenerativas pertinentes com a DP. O exercício físico regular incita o desenvolvimento e facilita a manutenção de tecidos neurais, proporcionando benefícios às funções neurológicas (ZIGMOND *et al.*, 2012). Além de melhorar as funções motoras em indivíduos com DP (KURTAIS *et al.*, 2008).

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 denteado do hipocampo (HC) em ratos. Consequentemente, o exercício físico oportuniza uma melhora na performance motora, na função cognitiva bem como uma redução da mortalidade e incidência da DP (CHEN, 2003; TILLERSON *et al.*, 2003 *apud* CHO *et al.*, 2013; GÓES *et al.*, 2014; COSTA, 2016).

Em um modelo experimental de DP, o exercício físico foi capaz de provocar menores déficits após a lesão, além de elevar a taxa de 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).

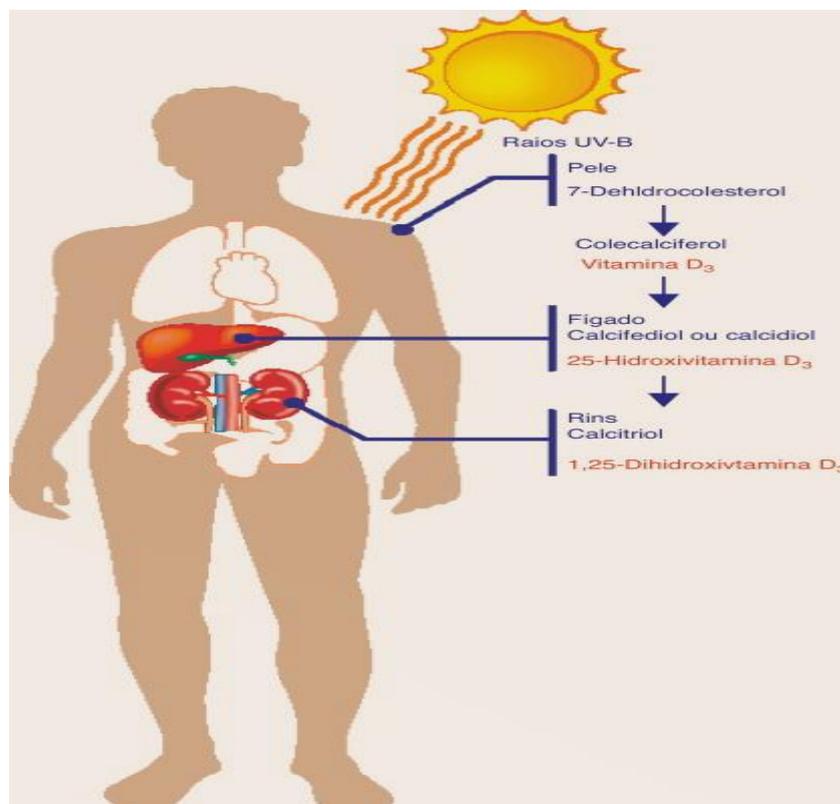
O exercício físico regular beneficia pacientes com DP, apresentando uma ação satisfatória para atenuar ou prolongar o aparecimento dos sintomas, garantindo alguma independência para os acometidos. Assim, é conveniente prescrever tratamento fisioterápico em todas as fases da DP, destacando que cada sujeito precisa ser analisado e tratado particularmente, com destaque na orientação e reabilitação de acordo com as alterações funcionais (BOELEN, 2007). O exercício físico regular, principalmente o aeróbico, é benéfico para pacientes com DP, pois

reduz sintomas como a bradicinesia, hipocinesia e distúrbios da marcha, sendo importante ferramenta no auxílio da terapia medicamentosa (RUBERT; ESTEVES, 2007).

### 1.7 Doença de Parkinson e suplementação de VD

A VD foi primeiramente assinalada como uma vitamina no século XX e atualmente apontada como um hormônio, sendo encontradas duas formas principais, são elas: VD2 (ergocalciferol) e VD3 (colecalfiferol) (Figura 15) (PETERS, MARTINI, 2014). Em humanos, cerca de 80 a 90% da VD necessária ao metabolismo é sintetizada endogenamente a partir de reações iniciadas em camadas profundas da derme. O sol emite um espectro de radiação eletromagnética. A radiação UVB compreende os comprimentos de onda entre 290 nm e 315 nm, a qual é responsável pela fotólise da provitamina D3 na epiderme e derme (HOLICK, 2006). Os 10 a 20% restantes são adquiridos através da dieta (HOLICK, 2008; WRZOSEK *et al.*, 2013).

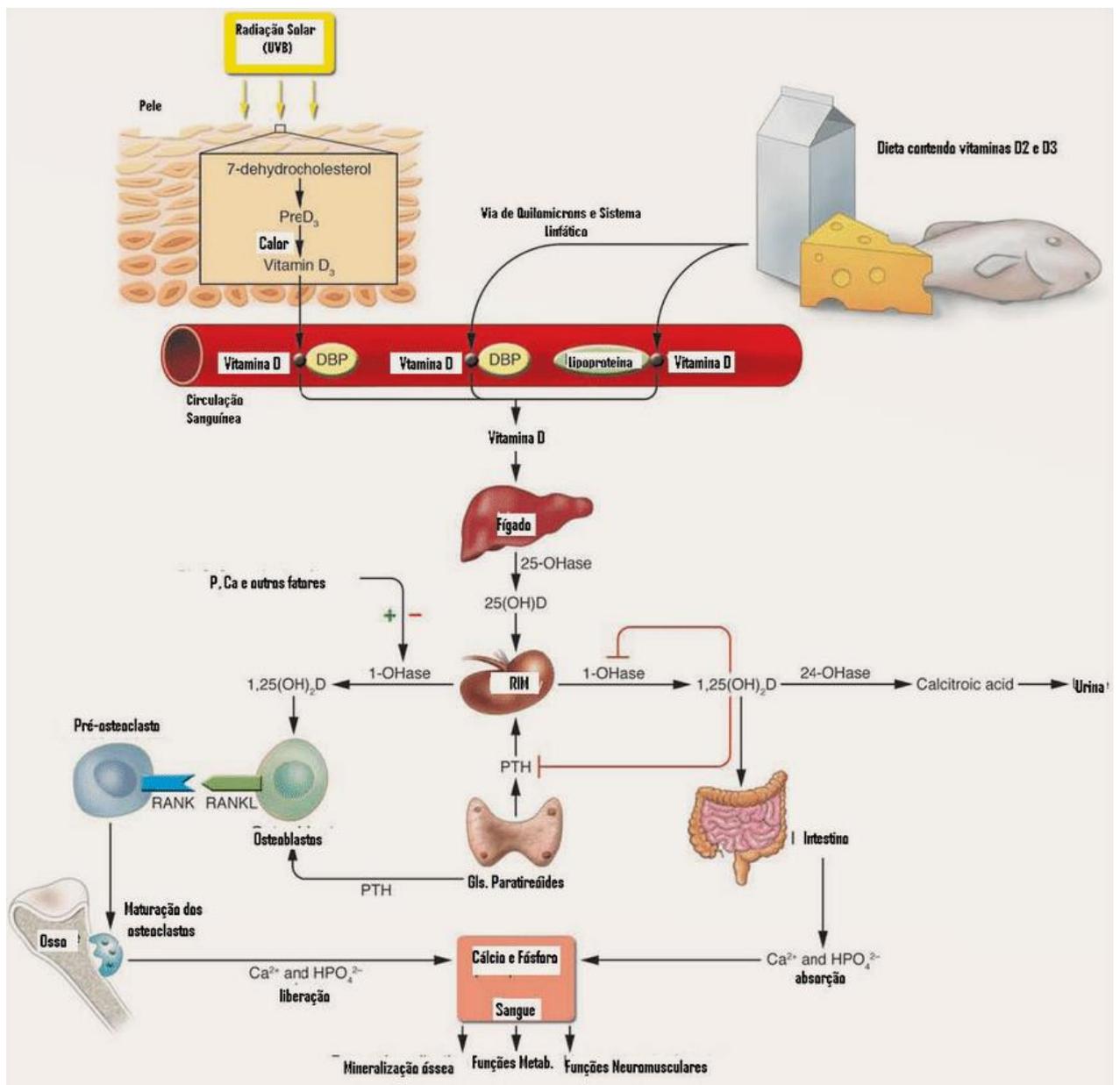
**Figura 15** - Nomenclaturas da VD



Fonte: Lichtenstein *et al.*, 2013.

A VD3 é sintetizada na pele dos seres humanos e identificada por ter sua absorção pela exposição à radiação ultravioleta B (RUVB), sendo consumida na dieta através da ingestão de alimentos de origem animal, dentre os quais podemos citar: salmão, atum, sardinha, gema do ovo, fígado, leite e derivados. Em contrapartida, a VD2 é de origem vegetal, adquirida a partir de leveduras e plantas. A Figura 16 ilustra os principais processos metabólicos envolvidos na ativação da VD e os tecidos nos quais ela atua (GIL *et al.*, 2018; MAEDA *et al.*, 2014; WRZOSEK *et al.*, 2013).

**Figura 16** - Principais processos metabólicos envolvidos na ativação da VD e os tecidos nos quais ela atua



A figura acima esquematiza o metabolismo da VD e apresenta alguns elementos, como minerais e hormônios, que são afetados pela ação da VD. Demonstra desde suas primeiras hidroxilações até o seu envolvimento na absorção do cálcio e sua ação em vários outros tecidos do corpo. Observa-se o caminho fisiológico da VD, desde sua ativação na pele até o seu destino final, cujo objetivo é aumentar e auxiliar a absorção de cálcio intestinal para a corrente sanguínea, além de seu transporte para os principais órgãos envolvidos em seu metabolismo: fígado, rins, glândulas paratireoides e ossos. Fonte: Adaptado de Holick, 2006.

A recomendação de VD, de acordo com as *Dietary Reference Intakes* (DRI) (2017), (valores de referência de ingestão utilizados para a avaliação e planejamento de dietas para indivíduos saudáveis) é de 10 µg/d para todas as faixas etárias e sexos e, em concordância com as *Recommended Dietary Allowances* (RDAs) (2011), é de 15 µg/d até os 70 anos e de 20 µg/d após os 70 anos. O nível máximo de VD tolerado, *Tolerable Upper Intake Levels*, para a população adulta e idosa é de 100 µg/d.

Ressalta-se que a suplementação de VD entre sujeitos com hipovitaminose D é cada vez mais frequente, sendo o colecalciferol (VD3) mais efetivo que o ergocalciferol (VD2), proporcionando uma meia-vida maior e aumentando a concentração sérica de VD. A dose diária para atingir um nível considerável de VD, em Unidades Internacionais (UI), é de 600 UI de 1 até 70 anos, incluindo gestantes e lactantes, e 800 UI para idosos maiores de 70 anos. Em indivíduos que apresentam hipovitaminose D (<20 ng/mL) é observada sua regulação com a suplementação de 1.000 UI/dia ou até mais. Para cada 100 UI tem-se um aumento de 0,7 a 1,0 ng/mL de 25 (OH) D sérica (MAEDA *et al.*, 2014; CATARINO *et al.*, 2016). Portanto, a VD é atuante na absorção de cálcio e fósforo, contribuindo efetivamente na mineralização óssea (CATARINO *et al.*, 2016).

Destaca-se que baixos níveis séricos de VD podem estar conexos com outras incidências, como diminuição da capacidade física, menor exposição ao sol, maior frequência de polimorfismos nos genes do VDR (Receptor de VD), efeito colateral de medicamentos, além de fatores nutricionais. Sabe-se que a VD exibe uma ação adicional muito relevante no sistema nervoso central, bem como na neuroproteção e na neuromodulação (KIM *et al.*, 2018).

A função neuronal depende da absorção e ativação da VD, caracterizando uma forte atividade antioxidante, diminuindo a peroxidação lipídica e aumentando as

enzimas que protegem contra a oxidação. Acredita-se que o estresse oxidativo desempenhe um papel na morte celular dopaminérgica na DP. Danos ao cérebro, causados pelo estresse oxidativo, também podem contribuir para a disfunção cognitiva em doenças neurodegenerativas (GATTO *et al.*, 2016). Coletivamente, os efeitos fisiológicos da VD nas funções cerebrais incluem a promoção da neurotransmissão, neurogênese, sinaptogênese, depuração amilóide e a prevenção da morte neuronal (SOMMA *et al.*, 2017).

O envolvimento da VD nas funções cerebrais é evidenciado pela presença da enzima 25(OH)D3-1 $\alpha$ -hidroxilase, e também dos receptores de VD (VDR), principalmente no hipotálamo e nos neurônios dopaminérgicos da substância negra (EYLES *et al.*, 2005; WRZOSEK *et al.*, 2013), sugerindo-se, inclusive, uma relação entre insuficiência de 25(OH) com o desenvolvimento ou a progressão da DP.

Estudos recentes demonstram que pacientes com DP têm concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D (25 (OH) D) mais baixas do que os controles. Além disso, os baixos níveis dessa vitamina estão associados com aumento do risco de sintomas clássicos de doenças neurodegenerativas, tais como: comprometimento cognitivo, funções motoras prejudicadas, declínio da memória, quedas e alterações no equilíbrio (SLEEMAN *et al.*, 2017; KODUAH *et al.*, 2017). Os receptores de VD e a enzima que converte a 25-hidroxivitamina D em VD ativa são encontrados em todo o cérebro (RIMMELZWAAN *et al.*, 2016). A VD3 inibe a ativação da micróglia, protegendo os neurônios dopaminérgicos e aumentando a expressão do fator neurotrófico derivado da linha de células da glia, além de facilitar a neuroproteção (KIM *et al.*, 2018).

As pesquisas sugerem que a existência do VDR (receptores de VD) e da enzima 1- $\alpha$ -hidroxilase no cérebro humano, principalmente nos neurônios dopaminérgicos da substância negra, é correlacionado com a severidade e duração da DP (DING *et al.*, 2013; WRZOSEK *et al.*, 2013) e até mesmo com o risco para desenvolver a doença (KENBORG *et al.*, 2011; KNEKT *et al.*, 2010). Em uma investigação conduzida por Knekt *et al.* (2010), foi evidenciado que pessoas com concentrações de 50 nmol/l de VD tinham 65% menos chances de desenvolver a DP, corroborando com os resultados de Newmark *et al.* (2007), os quais despontaram que a carência crônica de VD é um fator de risco para a DP.

Um estudo conduzido por Evatt *et al.* (2011), em que realizaram a comparação entre níveis séricos de 25(OH) e sua relação com DP e Alzheimer, uma doença também degenerativa, demonstrou insuficiência de 55% para os indivíduos com Parkinson e 46% para os indivíduos com Alzheimer, evidenciando que a vitamina D pode estar envolvida da patogenia, progressão e manifestação clínica da DP.

É sabido que os sintomas motores da DP estão relacionados à perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, afetando o equilíbrio, a marcha e a força muscular. Há uma crescente proeminência de que a VD influencia toda a função neuromuscular. Indivíduos que apresentam hipotavitaminose D exibem atrofia muscular e perda das fibras tipo II, evidenciando a presença de receptores específicos de VD nos músculos, responsáveis pela síntese proteica celular e, por consequência, melhora na função muscular (DHESI *et al.*, 2002; PETERSON *et al.*, 2013).

Pesquisas têm demonstrado implicações neuroprotetoras da VD em estudos com animais *in vivo* e *in vitro* (LIU *et al.*, 2013; SANCHEZ *et al.*, 2009). Dessa maneira, tem-se reportado que a 1,25(OH)2D3 pode induzir o GDNF, que são os fatores neurotróficos derivados da glia, os quais exercem importante função no processo de regeneração de fibras nervosas lesionadas (WANG *et al.*, 2001). A administração de 1,25(OH)2D3 aumenta os níveis de GDNF no córtex cerebral de ratos e a administração intraperitonal de 1,25(OH)2D3 aumenta os níveis de GDNF no corpo estriado de ratos, demonstrando que a 1,25(OH)2D3 pode modular a expressão do GDNF, proporcionando proteção e/ou reparação dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, pela indução de fatores neurotróficos no cérebro (SANCHEZ *et al.*, 2009).

Portanto, níveis plasmáticos de VD, obtidos por meio da dieta ou por meio da exposição solar (WANG *et al.*, 2015), estão associados à patogênese da DP (ZHANG *et al.*, 2014). As pesquisas de Eyles *et al.* (2005) e Wrzosek *et al.*, (2013) indicam que a existência do VDR e da enzima 1- $\alpha$ -hidroxilase no cérebro humano, principalmente nos neurônios dopaminérgicos da substância negra, é associado com a severidade e duração da DP (DING *et al.*, 2013) e até mesmo com o risco para desenvolver a doença (KENBORG *et al.*, 2011).

Em uma investigação conduzida por Knekt *et al.*, (2010), foi evidenciado que indivíduos com concentrações de 50 nmol/l de VD apresentaram uma menor chance de desenvolver DP; em torno de 65%. Dados da pesquisa de Newmark *et al.* (2007) mostraram que a deficiência crônica de VD é um fator de risco para a DP. A VD tem apontado resultados neuroprotetores, o que evidencia a sua função em regular a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  no cérebro, modulando, por conseguinte, a morte neural, já que o  $\text{Ca}^{2+}$  possui relevante papel nesse processo, compreendendo a excitabilidade neural e expressão gênica (BREWER *et al.*, 2001).

### **1.8 Relevância e justificativa**

Diante das transformações demográficas no Brasil e no mundo, pondera-se basilar o aparecimento e/ou aperfeiçoamento de estratégias propensas para a melhoria da qualidade de vida e valorização da pessoa idosa, sejam estas de cunho farmacológico ou não, visto que esta população se encontra mais susceptível às diferentes patologias, dentre as quais as neurodegenerativas, como DP. É sabido que as intervenções terapêuticas utilizadas até o momento, notadamente as ações farmacológicas, apresentam suas expressivas contribuições, no entanto, exibem limitações no percurso do tratamento da doença.

O tratamento da DP se dispõe a preservar e melhorar a condição do paciente com relação à independência funcional, reduzindo desconfortos e agravos da patologia. Os sintomas são remediados pela 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L – Dopa), o precursor bioquímico da dopamina (LIM *et al.*, 2015). A levodopa, após adentrar a barreira hemato-encefálica, é convertida em dopamina pela dopa descarboxilase, desempenhando seus efeitos, especialmente no núcleo estriado (CAMPOS, 2010).

Contudo, o tratamento farmacológico contínuo com L-Dopa, reconhecido como padrão ouro para DP, está associado com decorrências motoras adversas, como discinesia, a qual está associada à atividade acentuada de neurônios colinérgicos no corpo estriado (LIM *et al.*, 2015), bem como flutuações motoras (DAVID *et al.*, 2012). Consequentemente, tratamentos não farmacológicos como a prática do exercício físico (EARHART *et al.*, 2015) e suplementação de VD (SUZUKI *et al.*, 2013), associados ao convencional têm como prerrogativa reduzir a

progressão da doença (FALVO *et al.*, 2008), tendo como premissa uma melhor qualidade de vida.

No passado, o exercício físico não era preconizado para pacientes com diagnóstico de DP, por entender que este não proporcionava melhorias aos pacientes ou ainda poderia ocasionar prejuízos (HIRSCH; FARLEY, 2009). Contudo, evidências advindas de diferentes estudos, descrevem que o exercício, ou a fisioterapia, desempenham uma implicação benéfica nos predicados cardinais da DP. Considera-se que o exercício físico regular desempenhe um resultado profícuo sobre as condições neuroquímicas (AGUIAR *et al.*, 2007; CARVEY; PUNATI; NEWMAN, 2006; TUON *et al.*, 2012).

O exercício físico aeróbico e a suplementação da VD têm mostrado sua competência junto à terapia da DP, por serem capazes de operar em múltiplos mecanismos patogênicos da doença, como no estresse oxidativo e diminuição da excitotoxicidade. O exercício físico e a suplementação da VD constituem como uma ação não invasiva para alcançar a neuroproteção, com o desígnio de se aperfeiçoar a resposta ao tratamento farmacológico (ARCHER; FREDRIKSSON, 2010; FREDRIKSSON *et al.*, 2011).

No entanto, os mecanismos que elucidam as implicações do exercício físico (AL-JARRAH *et al.*, 2010) e a suplementação da VD nos neurônios dopaminérgicos não estão inteiramente elucidados. Deste modo, estudos são imprescindíveis para designar os mecanismos neuroprotetores da prática do exercício físico e da suplementação da VD, que apresentem seus efeitos benéficos na diminuição da progressão da DP e na melhora da qualidade de vida, o que evidencia a relevância desta pesquisa. De tal modo, o exercício físico e a suplementação da VD pode outorgar neuroproteção, tornando mais lento o desdobramento e progressão da doença por meio de mecanismos adaptativos de vias de sinalização afetadas.

Considera-se, portanto, importante avaliar os efeitos benéficos do exercício físico e suplementação da VD na progressão da DP, oferecendo assim uma estratégia a ser combinado ao tratamento tradicional da DP.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do exercício físico associado à suplementação da VD na lesão estriatal unilateral por 6-OHDA em ratos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do exercício físico associado à suplementação da VD nas alterações de comportamento rotacional, induzidos pela apomorfina;
- Avaliar os efeitos do exercício físico associado à suplementação da VD nas alterações sobre o desempenho motor nos testes do campo aberto, assimetria no uso da pata anterior no teste do cilindro, *rotarod*;
- Avaliar as alterações na memória no, y-maze e reconhecimento de objetos;
- Determinar os efeitos do exercício físico associado à suplementação da VD sobre as concentrações estriatais de DA e de seu metabólito (DOPAC) por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC);
- Determinar os efeitos neuroprotetores do exercício físico associado à suplementação da VD na peroxidação lipídica (MDA) e produção de nitrito;
- Determinar potencial antioxidante, através da produção de glutathiona redutase (GSH);
- Analisar os efeitos do exercício físico, associado a suplementação da VD na imunexpressão para a enzima tirosina hidroxilase (TH) por meio de ensaios imunohistoquímicos;

- Analisar os efeitos do exercício físico, associado a suplementação da VD na imun expressão para o transportador de dopamina (DAT), por meio de ensaios imunohistoquímicos;
- Analisar os efeitos do exercício físico, associado a suplementação da VD na imun expressão para proteína glial fibrilar ácida (GFAP), e fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) por meio de ensaios imunohistoquímicos;
- Analisar os efeitos do exercício físico, associado a suplementação da VD na imun expressão para alfa-sinucleína, e Receptor de VD (VDR), por meio de ensaios imunohistoquímicos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*), com peso variando entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais permaneceram em caixas de prolipropileno com, no mínimo 4, à temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade.

Todo o estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal preconizados pelas resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), com protocolo sob nº 82/2016 (ANEXO 1).

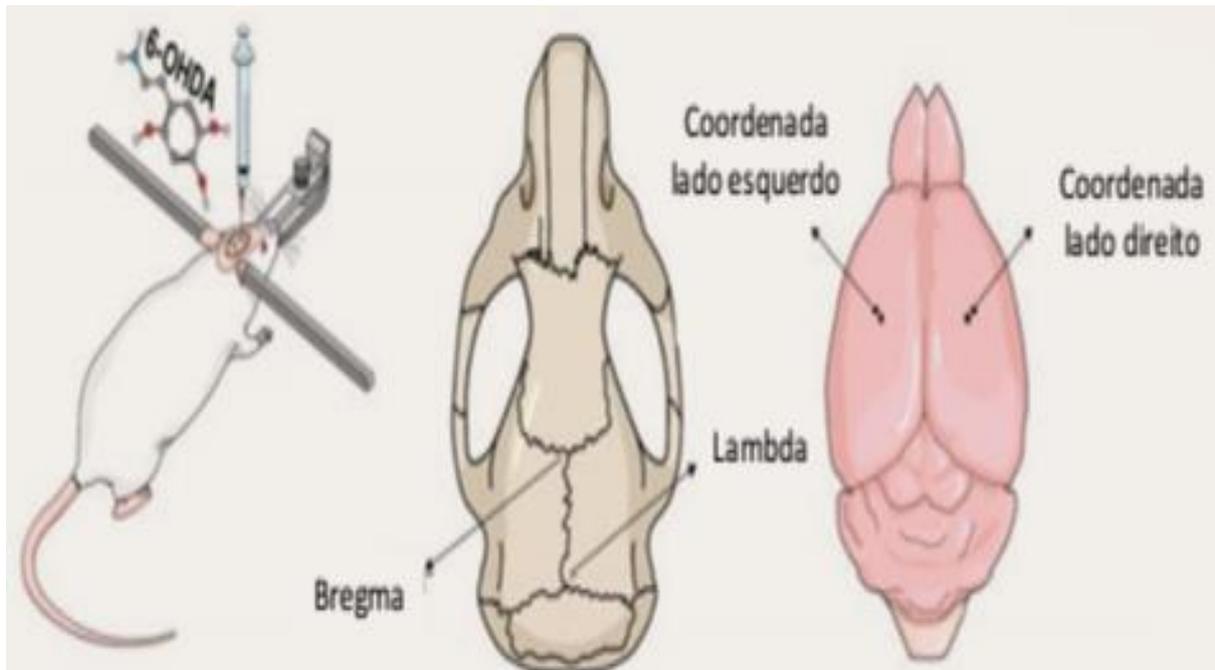
#### **3.2 Drogas e Reagentes**

As drogas utilizadas: 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma Aldrich, USA), apomorfina (Sigma Aldrich, USA), cloridrato de Cetamina (Vetanarcol®, Laboratório König S/A), cloridrato de xilazina (Kensol®, Laboratório König S/A).

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

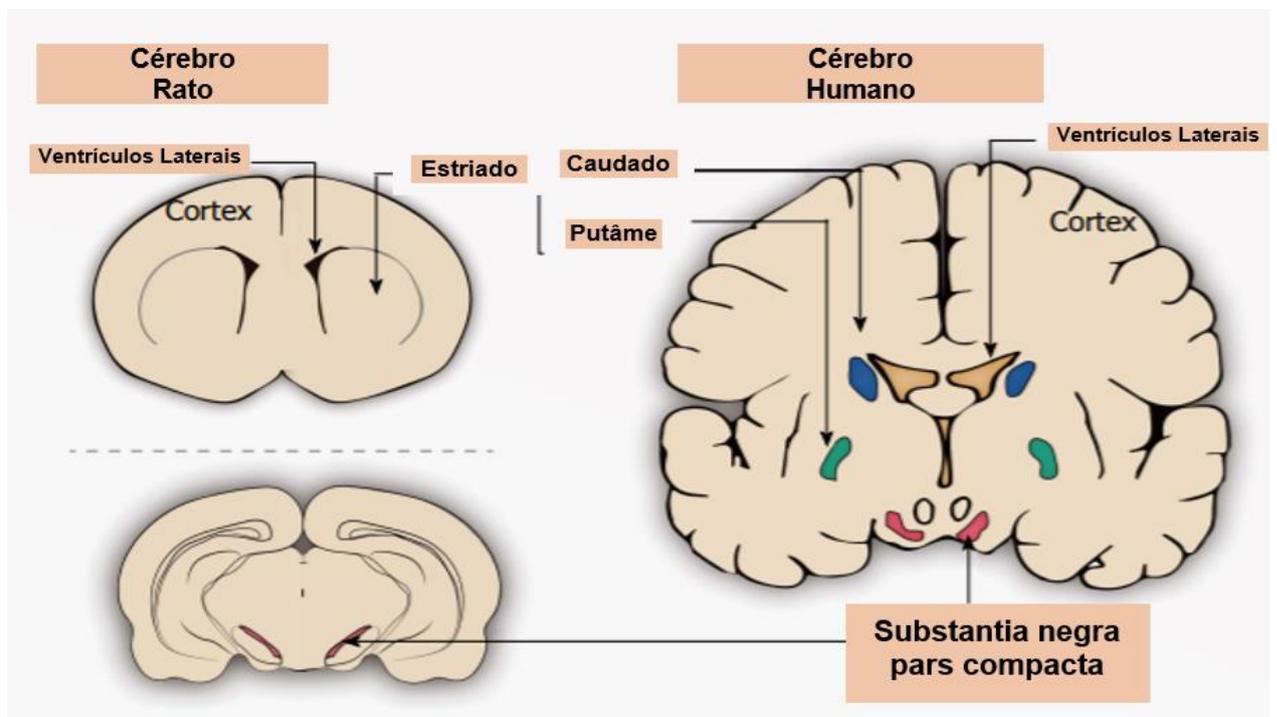
Os procedimentos para lesão na área cerebral corpo estriado (CE) (Figura 18) consistiram em um procedimento cirúrgico de estereotaxia (Figura 17). Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de xilazina (10 mg/kg, i.p.) e ketamina (100 mg/kg, i.p.). Os animais foram submetidos à tricotomia da região superior da cabeça, para serem posteriormente fixos ao aparelho estereotáxico (Figura 19). Executou-se uma incisão de, aproximadamente, 2 cm de comprimento com um bisturi na parte superior do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, a fim de localizar o bregma (junção entre as suturas sagital e coronal (Figura 17)).

**Figura 17** - Representação esquemática procedimento cirúrgico de estereotaxia



Fonte: adaptado de Gonçalves, 2020.

**Figura 18** - Representação esquemática de diferentes locais no rato e cérebros humanos



Os esquemas acima são seções coronais do estriado de rato e caudado humano (azul) e putãmen (verde) junto com a substância negra pares compactos (vermelho). O esquema é uma seção coronal ao nível da substância negra pares compacta (vermelho). Fonte: Adaptado de BORONAT-GARCÍA; GUERRA-CRESPO; DRUCKER-COLÍN; 2017).

**Figura 19** – Aparelho estereotáxico



ILLINOIS 60191-1109: USA STOELTING. SINCE 1896. Fonte: Arquivo pessoal.

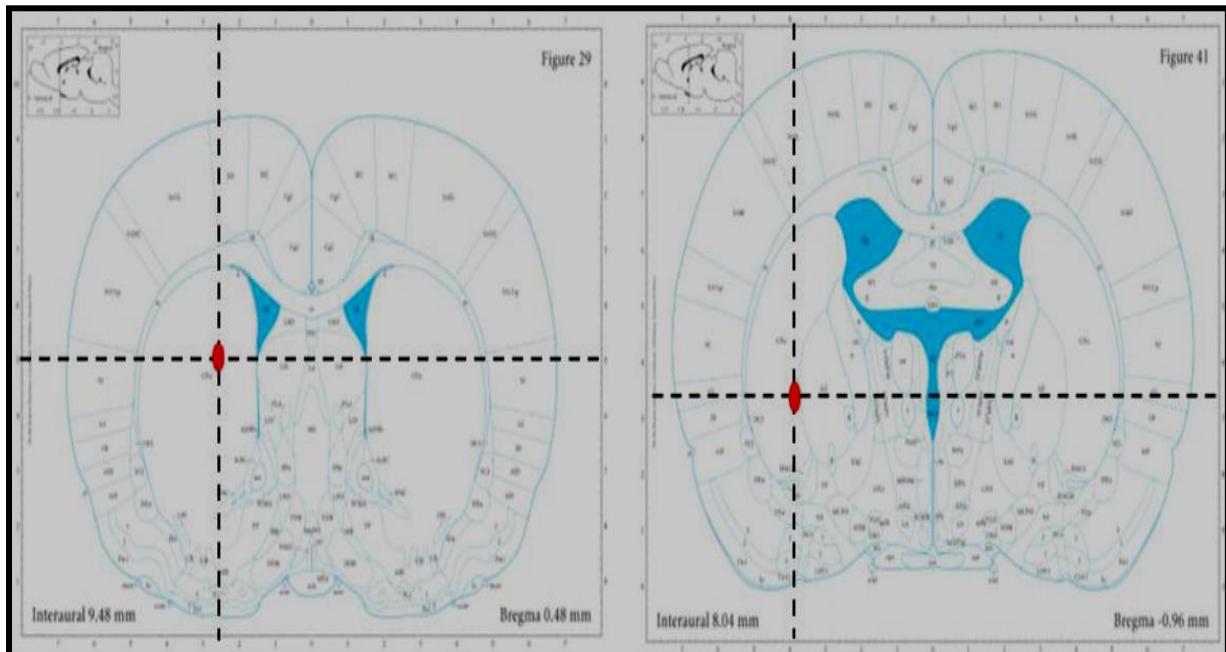
Os sítios, nos quais as lesões foram efetivadas, se localizavam nas coordenadas descritas no quadro 1, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1986) (QUADRO 1). Após a marcação das coordenadas, foi realizada as perfurações com uma broca. Constituíram em duas perfurações e administradas em cada uma (1  $\mu$ l de uma solução de 6-OHDA dissolvida em salina (0,9%) contendo 0,2% de ácido ascórbico, na concentração 12  $\mu$ g/ $\mu$ l) no corpo estriado direito (CED), utilizando-se de uma seringa de Hamilton de 5 $\mu$ l (Figura 20). Após a inserção da agulha na área de aplicação, a mesma permaneceu por um tempo de 5 min, a fim de assegurar que o conteúdo pudesse ser inoculado adequadamente (KIM *et al.*, 1998).

**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>
<b><i>Antero-posterior</i></b>	+ 0,5	- 0,9
<b><i>Médio-lateral</i></b>	- 2,5	- 3,7
<b><i>Dorso-ventral</i></b>	+ 5,0	+ 6,5

Fonte: PAXINOS; WATSON, 1986.

**Figura 20** – Figura esquemática representativa das 3 coordenadas estereotáticas para injeção intracraniana de 6-OHDA



No corpo estriado, indicada pelo ponto vermelho, de acordo com PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Elsevier: San Diego, Califórnia, 2006. Fonte: adaptado Paxinos; Watson (2006).

No decurso do 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). Introduziu-se a agulha nas mesmas coordenadas estereotáticas, seguida de infusão de salina estéril e veículo (ácido ascórbico a 2%). No seguimento, a incisão foi suturada com fio náilon 3.0 e o animal recolocado na caixa de polipropileno sob luz vermelha para manutenção da temperatura corpórea e recuperação.

### 3.4 Procedimento Experimental

#### 3.4.1 Suplementação com VD

A administração oral de VD, diluída em Tween® 80, aconteceu diariamente, com agulha curva de gavagem para ratos (Figura 21), no volume de 0,1 mL/10g de

peso. Destaca-se que a definição da dose se fundamentou no estudo de Amminger *et al.*, (2010). A dose utilizada no animal VD foi de 1µg/kg/dia, por 21 dias.

**Figura 21** - Canula de gavagem



Fonte: Agulha de gavagem para Rato, IC810, Marca: Aton. Características: Cânula, diâmetro 1,2mm; diâmetro da esfera 2,3mm (distal); ângulo da agulha 10 graus; comprimento da cânula 41,2mm) Arquivo pessoal.

### **3.4.2 Protocolo de exercício físico esteira e suplementação com VD**

Os animais foram distribuídos em 6 grupos, em concordância com o Quadro 2. Esses foram suplementados por gavagem, por meio de uma cânula com VD (1µg/kg/dia), por 21 dias, ressalta-se que durante o processo de tratamento os animais eram pesados a cada três dias para adaptação das suplementas de VD ao peso do animal. Realizou-se o exercício físico em esteira por 30 minutos, com uma velocidade de 20 cm/segundo, uma vez ao dia durante 21 dias consecutivos (Figura 22). Este procedimento iniciava-se 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; COSTA, 2017).

Destaca-se, que nos grupos com suplementação de VD e exercício físico, a administração incidia 30 minutos antes da realização do exercício. Posteriormente à aplicação do referido protocolo, os animais foram submetidos aos testes comportamentais e, em seguida, eutanasiados, sendo retiradas as áreas cerebrais para realização dos estudos neuroquímicos e imunohistoquímicos.

**Quadro 2** – Divisão dos Grupos, protocolo de Exercício Físico com Suplementação de VD

GRUPOS	Protocolo de Exercício
1 - Falso operado (FO), sem exercício	Cirurgia estereotáxica com injeção intraestriatal de salina.
2 - Falso operado (FO), com exercício	Cirurgia estereotáxica com injeção intraestriatal de salina + realização de exercício físico esteira por 30 minutos durante 21 dias.
3 - 6-OHDA, sem exercício	Grupo lesionado com 6-OHDA, injetada no CED (12 µg/2 µL, intraestriatal) sem exercício físico em esteira.
4 - 6-OHDA, sem exercício com Suplementação de VD	Grupo lesionado com 6-OHDA, injetada no CED (12 µg/2 µL, intraestriatal) + suplementação de VD (1µg/kg/dia) durante 21 dias.
5 - 6-OHDA, com exercício	Grupo lesionado com 6-OHDA, injetada no CED (12 µg/2 µL, intraestriatal) + realização de exercício físico esteira por 30 minutos durante 21 dias.
6 - 6-OHDA, com exercício e Suplementação de VD	Grupo lesionado com 6-OHDA, injetada no CED (12 µg/2 µL, intraestriatal) + suplementação de VD (1µg/kg/dia) + realização de exercício físico esteira por 30 minutos durante 21 dias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

**Figura 22** – Esteira automatizada constituída de 3 raias

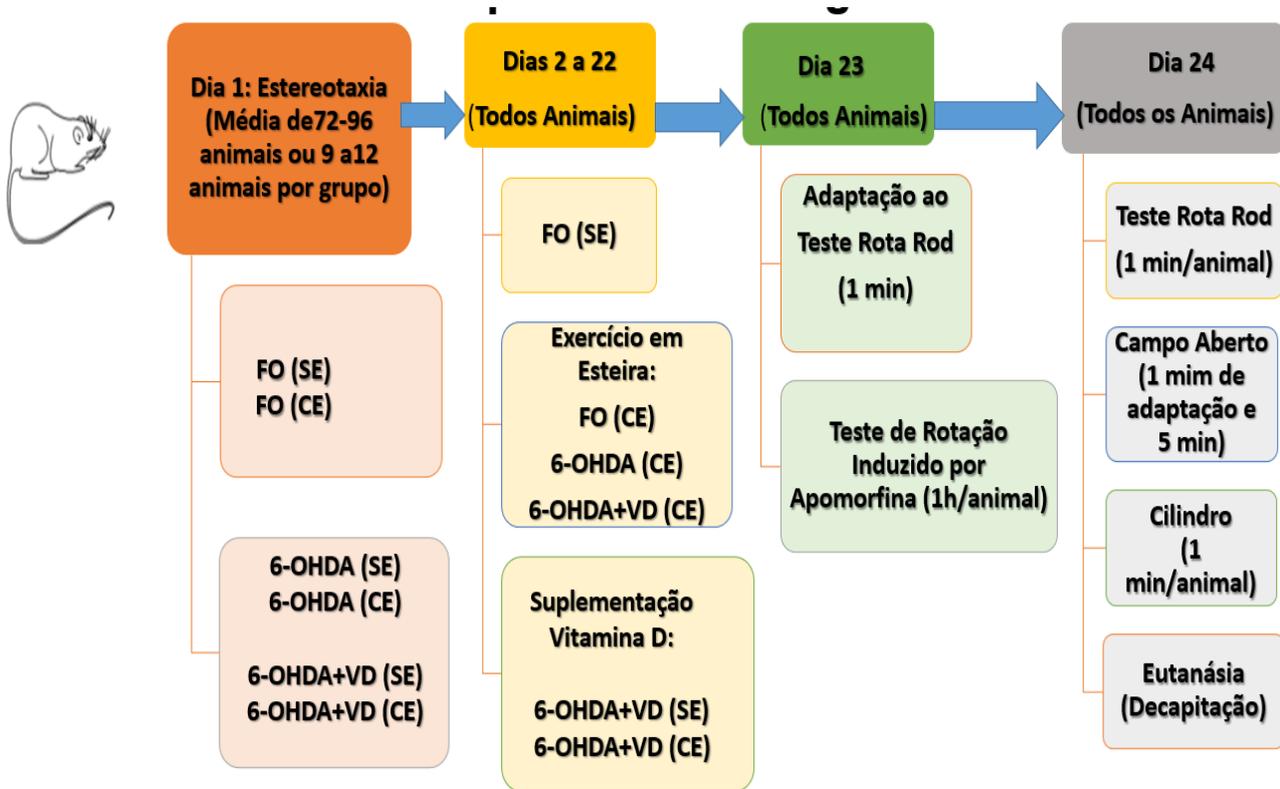


Fonte: Arquivo pessoal.

### **3.5 Testes comportamentais**

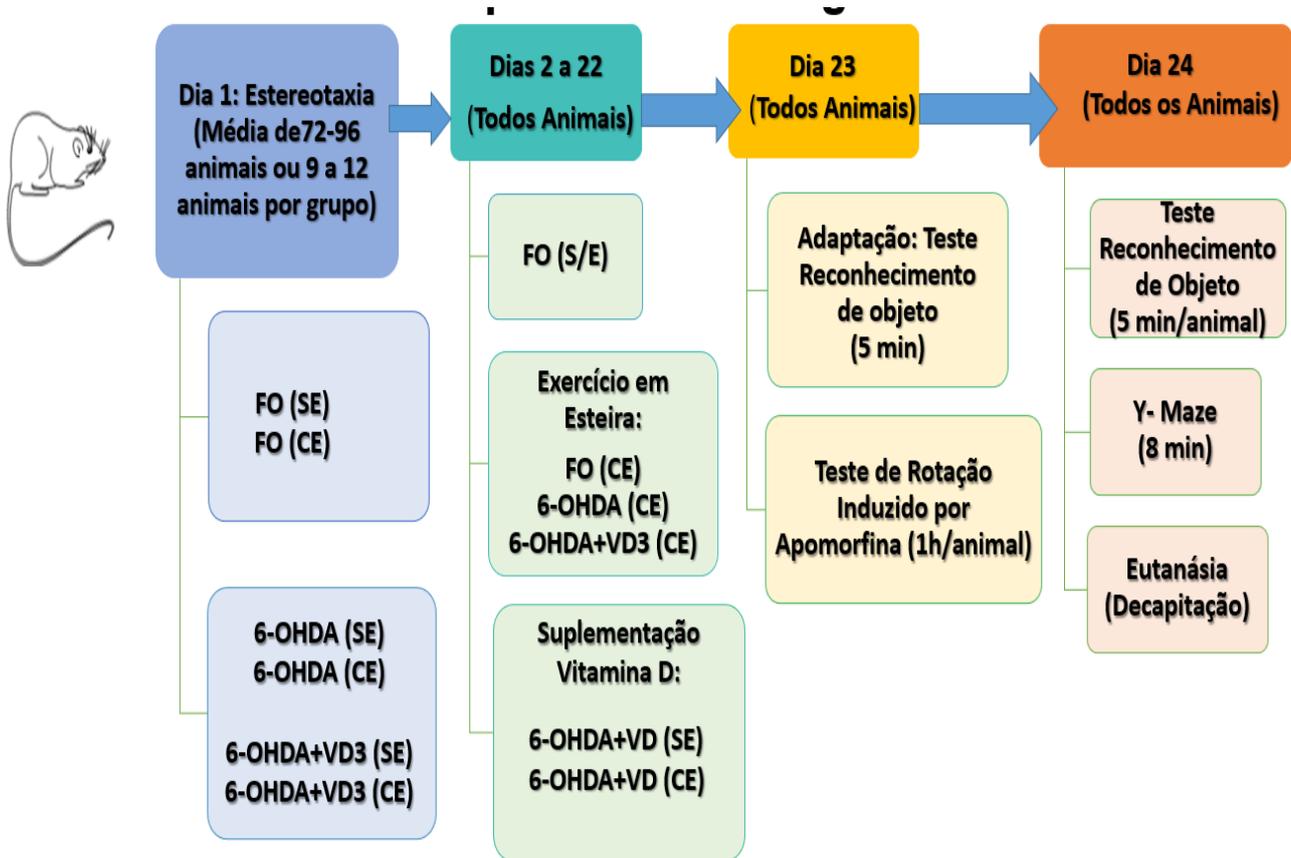
Os testes comportamentais foram utilizados para avaliar as decorrências da aplicação do protocolo de exercício físico em esteira e suplementação de VD. Após a aplicação do protocolo e suplementação com VD, os animais foram divididos em dois grupos. Ressalta-se que se utilizou uma média de 9 a 28 animais, em cada grupo experimental e para os diferentes testes. Os mesmos foram submetidos a testes para avaliar o comportamento rotacional, atividade locomotora e memória. Foram realizados: 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 como apresentados nos dois esquemas abaixo.

## 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, iniciava-se protocolo de exercício físico em esteira durante 21 dias, consecutivos e suplementação de VD. Após a aplicação do protocolo de exercício e suplementação de VD os animais eram submetidos ao teste de apomorfina. Após um período, 24h da aplicação da apomorfina os animais realizavam os testes comportamentais: RotaRod, campo aberto, cilindro e eutanasiados para realização dos testes neuroquímicos e imunohistoquímicos. Fonte: Elaborado pelo autor.

## Esquema 2 – Grupo 2: Desenho Experimental



No grupo 2, aplicação dos testes de memória e atividade rotacional: 1º dia, os animais sofreram a lesão estriatal pela 6-OHDA (falso operado). Vinte e quatro horas após, iniciava-se protocolo de exercício físico em esteira durante 21 dias, consecutivos e suplementação de VD. Após a aplicação do protocolo de exercício e suplementação da VD os animais eram submetidos aos pré-testes do reconhecimento de objeto, em seguida ao teste de apomorfina. Após um período, 24h 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.

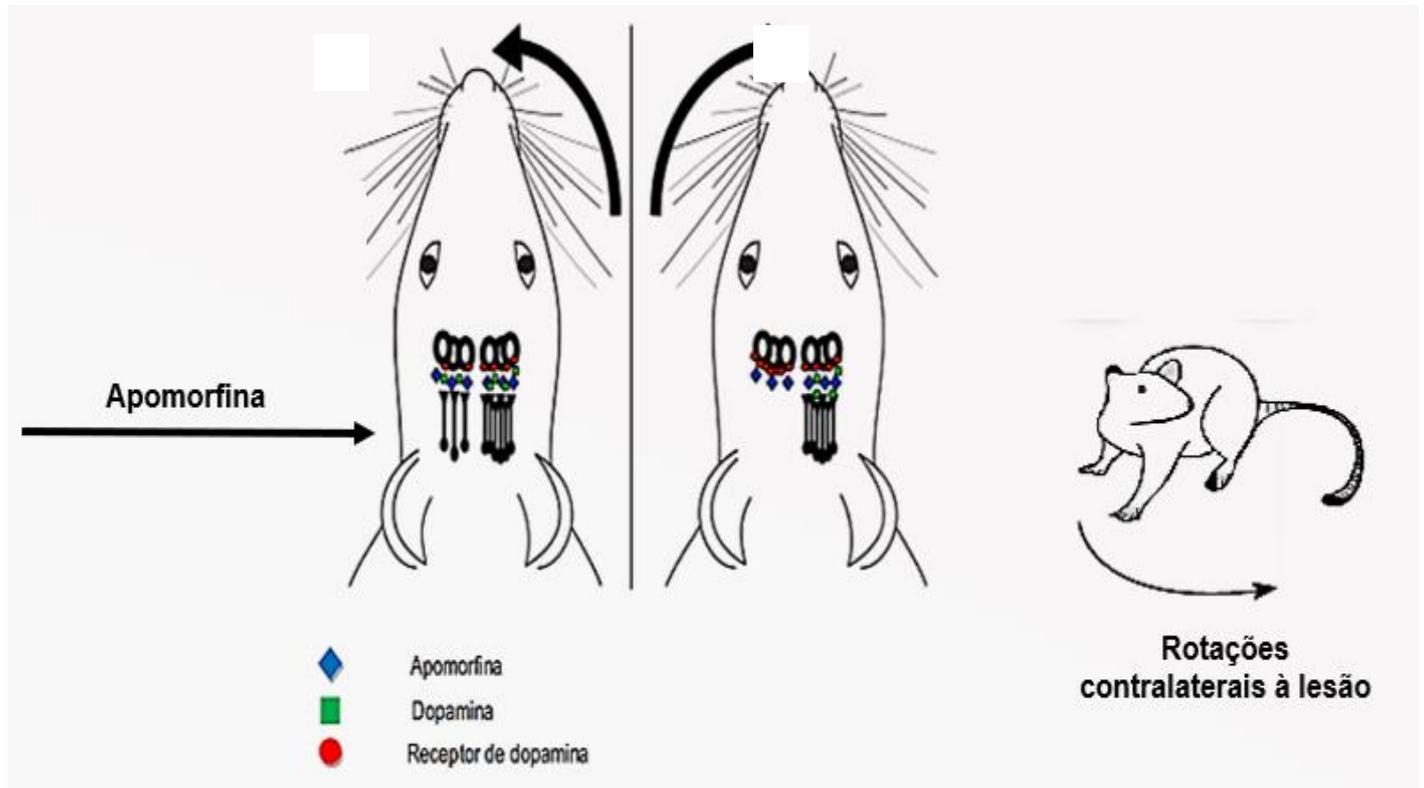
### **3.5.1 Teste rotacional com apomorfina**

Descreve-se que os primeiros achados experimentais de comportamento rotacional foram exercidos por Ungerstedt (1968) e Ungerstedt e Arbuthnott no ano de 1970. Sabe-se que a apomorfina é um agonista direto dos receptores dopaminérgicos e que sua administração, em animais lesionados unilateralmente com 6-OHDA, atua nas rotações contralaterais à lesão (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970). Sua atuação se efetua nos receptores dopaminérgicos D2 supersensibilizados na região lesionada (Figura 23) (SCHWARTING; HUSTON, 1996).

Por ser um agonista do receptor dopaminérgico que pode ativar os receptores pós-sinápticos de dopamina no corpo estriado, a desnervação dopaminérgica induzida por 6-OHDA em um hemisfério do estriado resulta em supersensibilidade pós-sináptica à dopamina no lado lesionado, de modo que a apomorfina aumenta a estimulação da atividade no lado lesionado para uma maior extensão do que no lado não lesado. A supersensibilidade faz com que os animais lesionados a girem contralateralmente ao lado lesado após a administração de apomorfina (GREALISH et al., 2010).

Destaca-se que os animais realizaram o teste rotacional 21 dias após a lesão estriatal com 6-OHDA. O teste de comportamento rotacional consistiu na observação das rotações ocasionadas pela administração da apomorfina (3mg/kg, i.p.) na direção contrária à lesão (lado contralateral), ponderando o número de rotações completas em volta do próprio eixo no período de uma hora (KIM *et al.*, 1998).

**Figura 23** – Perda parcial de receptores de neurônios dopaminérgicos nigroestratais

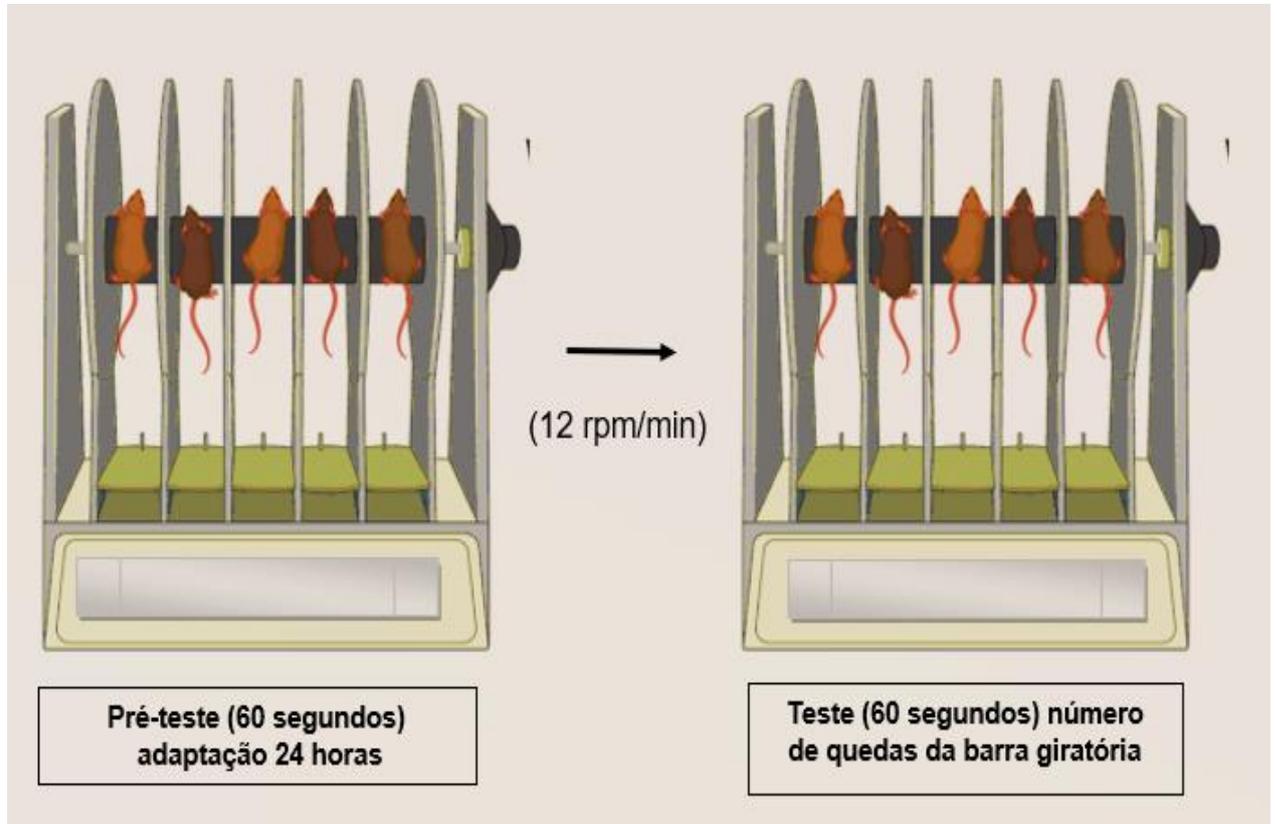


O animal gira para o lado que estiver com menos receptores, devido a uma assimetria nos hemisférios cerebrais, decorrente de uma *up regulation* dos receptores dopaminérgicos no lado lesionado. Fonte: adaptado de WIETZIKOSKI, 2006.

### 3.5.2 Teste rotarod

O *rotarod* apresenta como premissa a avaliação da coordenação motora e equilíbrio de roedores (PETZINGER; WALSH *et al.*, 2007). Consiste em uma barra giratória (Figura 24) que possibilita averiguar os potenciais de destacados anteriormente. No teste *rotarod* foram registrados o número de quedas da barra giratória (12 rpm/min) em 60s (DALLMEIER; CARLINI, 1981; DUNHAM; MIYA, 1957). Para concretização deste teste, foi imprescindível uma adaptação dos animais (pré-teste) 24 horas antes, seguindo o mesmo tempo e parâmetros realizados no teste.

**Figura 24 – Aparelho rotarod**

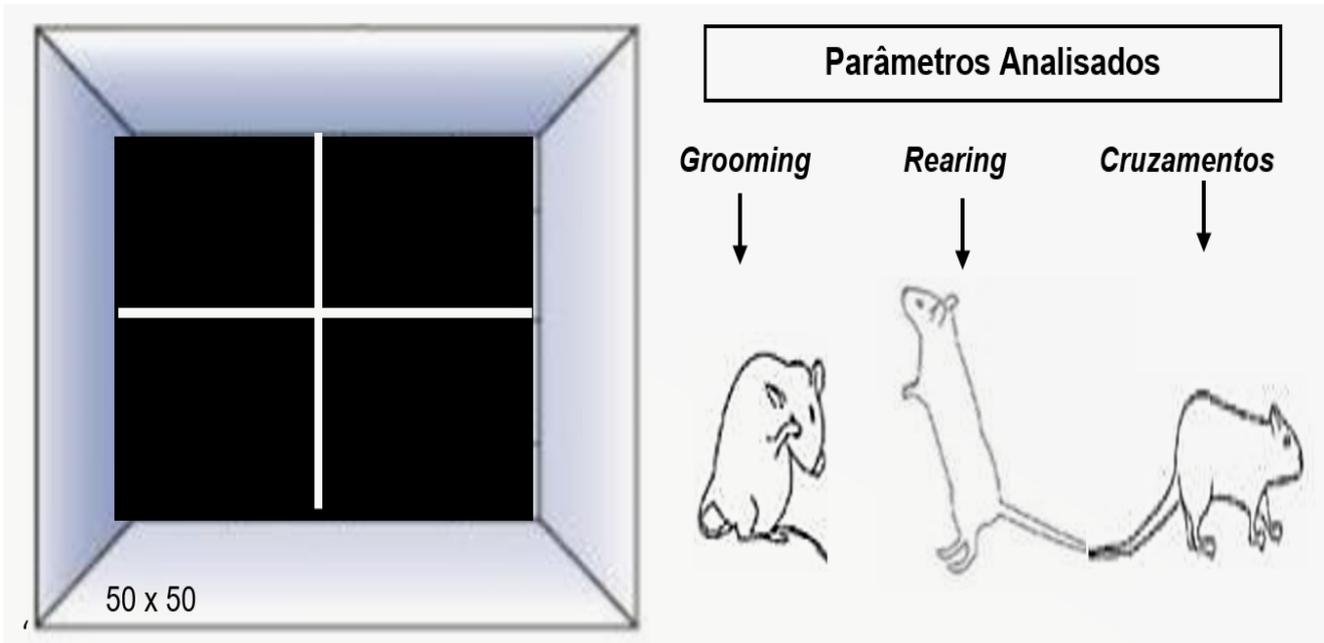


Fonte: Elaborado pelo autor.

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

Campo aberto é abalizado na metodologia delineada por Siegel (1946) e validado por Archer (1973). O campo aberto utilizado foi confeccionado em acrílico e consiste numa arena medindo 50 x 50 cm com fundo preto, dividido em quatro quadrantes iguais (Figura 25). Realizou-se o teste em seis minutos, porém o primeiro minuto consistia em um período de adaptação.

**Figura 25** – Arenado teste de campo e parâmetros avaliados



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os parâmetros estudados no decurso do experimento consistiram em: Número de cruzamentos (NC): cruzamento com as quatro patas de um quadrante para o outro (movimentação espontânea e exploratória); Número de *Grooming* (NG): comportamentos de autolimpeza; Número de *Rearing* (NR): levantamento de patas dianteiras para exploração vertical.

Destaca-se que o aparato utilizado era higienizado com álcool a 10% ao término de cada animal, evitando que o cheiro da urina e fezes interferissem no teste.

#### **3.4.4 Teste do Cilindro (Limb-use Asymmetry Test) (Adaptado de SCHALLERT *et al.*, 2000)**

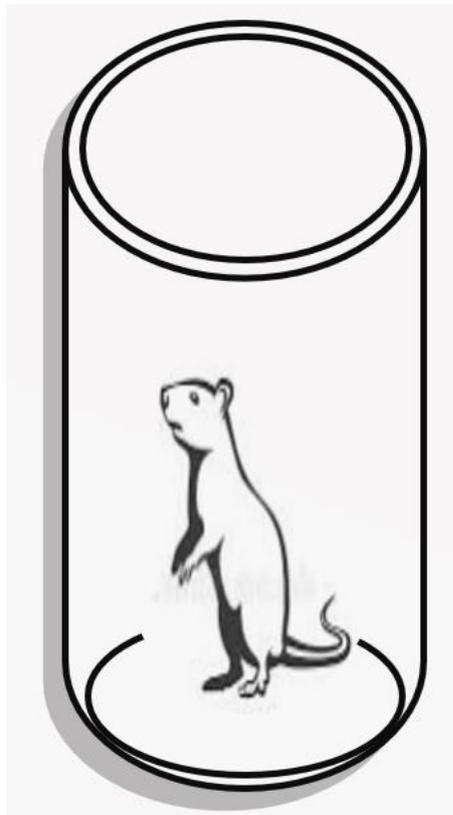
O teste do cilindro ou “Limb-use Asymmetry Test”, criado por Schallert *et al.* (2000), avalia a relação de assimetria na utilização dos membros anteriores na atividade exploratória vertical (*rearing*). Contudo, pode ser empregado para avaliar perda de DA nigroestriatal (TILLERSON *et al.*, 2001; 2002).

O equipamento operado consiste em um cilindro transparente de 18 cm de diâmetro e 40 cm de altura. Os animais foram colocados individualmente no aparelho com o objetivo de explorá-lo por um período de 5 min. Assim, foi registrado

o número de contatos do membro anterior não comprometido (ipsilateral, direito), do membro anterior comprometido (contralateral, esquerdo) e de ambos os membros mutuamente na parede do aparato durante a elevação e movimentos laterais (Figura 26). Quando os animais apresentavam um quantitativo menor que 10 contatos na parede do cilindro, estes foram tirados da análise (GULLEY, 2007).

Ressalta-se que o aparato utilizado era higienizado com álcool a 10% ao término de cada animal, evitando que o cheiro da urina e fezes interferissem no teste.

**Figura 26** - Animal durante o movimento de rearing no Teste do Cilindro



Fonte: Elaborado pelo autor.

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

O teste labirinto em Y (Y-maze) avalia a memória operacional (*working memory*) e o aprendizado. O aparato 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

27). O animal é colocado no ambiente por um período de 8 minutos para a verificação de alternância nos braços espontaneamente.

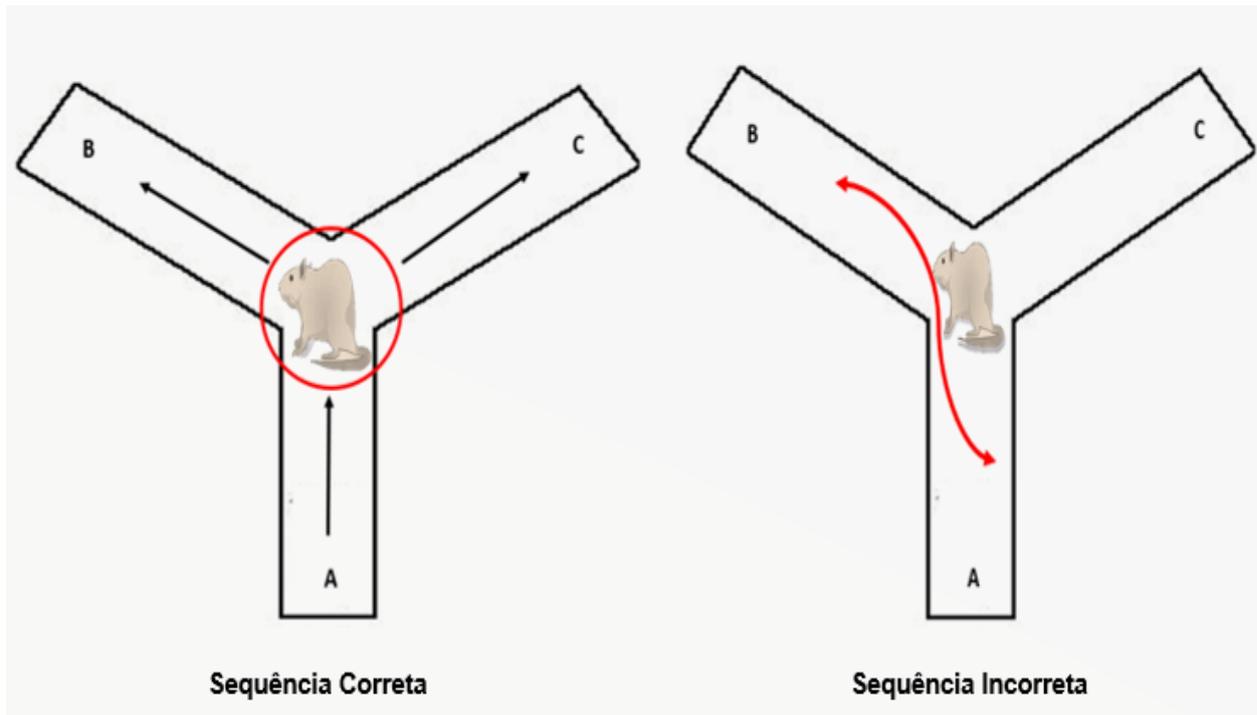
Observou-se a sequência dos braços nos quais os animais entraram, bem como as informações ponderadas, de forma a determinar o quantitativo de entradas nos braços sem repetição. Considera-se correto quando o animal alcança uma sequência de visitação nos braços sem retorno imediato ao braço anterior visitado.

A efetividade deste comportamento é balizada pelo elevado percentual de alternância nos grupos controles, uma vez que os animais podem lembrar em qual braço entraram anteriormente. Assim, a percentualidade das alterações é calculada como a razão entre o número de acertos e o número total de entradas executadas no decurso da observação (YAMADA *et al.*, 1996), de acordo com fórmula matemática apresentada abaixo:

**Alterações Espontâneas (%) = Números de acertos X 100**

**Número total de entradas – 2**

**Figura 27 – Teste Labirinto em Y (Y- Maze)**



Fonte: Elaborado pelo autor.

### **3.5.6 Teste Reconhecimento de objeto**

A memória de reconhecimento de objetos é a competência de distinguir, os objetos apresentados antecipadamente e objetos que não tenham. Roedores detêm uma tendência natural e peculiar de passar mais tempo explorando objetos novos do que aqueles conhecidos, descritos como antigos.

O teste incide em dois dias. No primeiro, antes de qualquer procedimento, os animais foram alocados no aparato com permanência de 5 minutos, sem contato com nenhum objeto, para adaptação ao ambiente. Em um período de 24 horas, dois objetos análogos foram colocados paralelos e os animais foram submetidos ao pré-teste em um período de cinco minutos (Figura 28). No mesmo dia, após uma retenção de 1,5 horas, foi examinada a memória de curta duração, onde o animal foi recolocado no aparato e submetido a um teste de cinco minutos com um objeto similar ao do pré-teste e um objeto novo (diferente) (Figura 28).

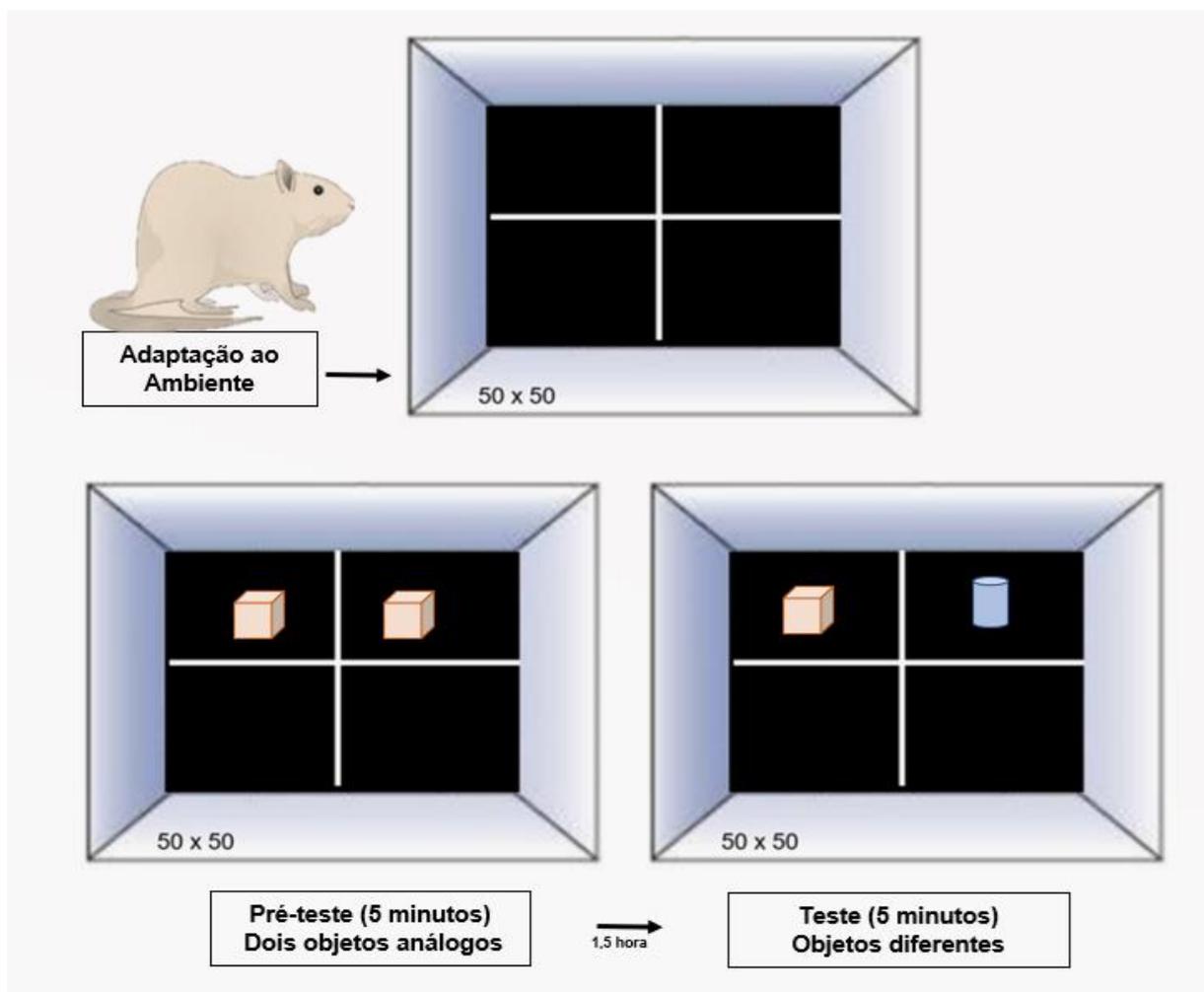
No mesmo dia, após uma retenção de 1,5 hora, foi examinada a memória de curta duração, onde o animal foi recolocado no aparato e submetido a um teste de

cinco minutos com um objeto similar ao do pré-teste e um objeto novo (diferente) (Figura 28).

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

Para o teste de reconhecimento de objeto, foi utilizada uma arena retangular medindo 50 x 50 cm, sendo o piso dividido em quatro quadrantes iguais, com objetos de plástico (Figura 28).

**Figura 28** – Teste Reconhecimento de objeto



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.6 Dissecação das áreas cerebrais

#### 3.6.1 Áreas cerebrais para testes neuroquímicos e imunohistoquímicos

Ao término dos testes de comportamento, os animais foram divididos para os testes neuroquímicos e imunohistoquímicos. Nos testes imunohistoquímicos, os animais escolhidos foram decapitados com uma guilhotina (Figura 29) sem utilização de anestésicos, para não ocorresse interferência nos resultados da pesquisa, por se tratar de um estudo que envolve o sistema nervoso central. 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 paraformaldeído 4% para fixação do material e, após 24h, esta solução foi substituída por álcool 70%.

**Figura 29** – Guilhotina



Fonte: Guilhotina para Roedores, EB 271 INSIGHT®. Medidas Base: 300mm x 300mm; Altura: 22mm; Facas Abertas: 170mm de altura; Altura de cada faca: 73mm; Peso: 4,5 Kg. Arquivo pessoal.

Os efeitos do exercício e a suplementação de VD sobre a lesão unilateral por 6-OHDA foram avaliados por meio de testes neuroquímicos, avaliando-se diferentes

áreas cerebrais (CPF, HP e CE) com o intuito de analisar a destruição progressiva produzida pela 6-OHDA no corpo estriado (área lesionada) e se a mesma pode afetar diferentes áreas cerebrais e não exclusivamente aos neurônios da via nigroestriatal.

Os animais foram decapitados como descrito anteriormente e os encéfalos retirados rapidamente posicionados 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 microdissecação.

Na dissecação do córtex pré-frontal (CPF), a porção precedente dos lobos frontais (em torno de 1,5 mm a partir do bulbo olfatório) foram retiradas por meio de uma secção bilateral manuseando uma tesoura de microdissecação (MACHADO, 2000 *apud* SOUSA, 2015).

Após a remoção do CPF, seguindo a fissura sagital mediana, o córtex divulsionado foi afastado para os lados, exibindo a região hipocampal (HC) e parte do corpo estriado (CE). O HC e o CE, foram separados das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação. Terminada a dissecação, as áreas foram acondicionadas em tubos de microcentrífuga (Eppendorf®), devidamente indentificados, pesadas e armazenadas a -70°C até a execução da análise.

### **3.7 Determinação da concentração de monoaminas (DA) e seu metabólito (DOPAC) 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.

A apreciação e 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

e DOPAC foram eletronicamente identificados 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 (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculados no programa *Microsoft Excel®* em um computador e os resultados expressos em ng/g de tecido.

### **3.8 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 identificar o efeito do protocolo de exercício físico em esteira de intensidade moderada e suplementação com VD, 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% e centrifugado (7000 rpm/15 min). O volume de 150 µL do sobrenadante de cada amostra foi recuperado e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%. 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 em 535 nm e expressa como micrograma de malonildialdeído (µg MDA) /g de tecido (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

### **3.9 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 e suplementação com VD 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 ( $\text{NaNO}_2$ ) e dissolvidos em 10 mL de água destilada (estoque-10mM). Foram feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ , 0,625  $\mu\text{M}$ , 0,312  $\mu\text{M}$ . 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 (800 rpm, 10 min), os sobrenadantes foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante foi incubada com 100  $\mu\text{l}$  do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1%/N-(-1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1%/ $\text{H}_3\text{PO}_4$  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 ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada a partir de uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ .

### **3.10 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. Sabe-se que problemas na síntese de glutathiona estão associados a determinadas doenças, nas quais os níveis de glutathiona e enzimas que atuam no seu metabolismo podem encontrar-se 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).

### **3.11 Análises Imunohistoquímicas**

#### **3.11.1 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 lesionado.

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 (1:200, anti-TH) (SAB4502966 – Sigma®)

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 diaminobenzidina 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 análise em microscópio.

### **3.11.2 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 recaptação pré-sináptica desse neurotransmissor, ou seja, o transporte de dopamina para o sítio pré-sináptico (recaptação). 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 (Sc1433 - Sigma®) diluído em 1:200, de acordo com as instruções dos fabricantes.

### **3.11.3 Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)**

A identificação histológica de astrócitos normais ou em situação patológica tem sido feita por meio de método imunohistoquímico que detecta antígenos da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), componente dos filamentos de tamanho intermediário do citoesqueleto celular, presente nos astrócitos e em diferentes células (ENG; GHIRNIKAR 1994; CULLEN 1997). A expressão de GFAP, por si só, deve ser considerada nas diversas situações. Em certas lesões, a imunorreatividade a essa proteína é maior devido à melhor preservação frente aos fixadores (CULLEN 1997; ENG; GHIRNIKAR 1994).

A distribuição de astrócitos imunorreativos à GFAP em SNC tem sido pesquisada em diferentes conjunturas. Kálman e Hajós (1989) e Hajós e Kálman (1989) conseguiram um meticuloso mapeamento de astrócitos imunorreativos à GFAP em ratos. A proteína glial fibrilar ácida (GFAP), subunidade dos filamentos

intermediários do citoesqueleto celular, encontra-se presente no citoplasma de astrócitos. As técnicas imunohistoquímicas com anticorpos primários anti-GFAP são comumente empregadas para identificar astrócitos no sistema nervoso, consentindo averiguar ainda sua hipertrofia. As técnicas adotam os protocolos do item anterior, sendo alterado apenas os anticorpos primários anti-GFAP (Sc33673 – Santa Cruz®) na diluição 1:200, de acordo com as instruções dos fabricantes.

#### **3.11.4 Fator neurotrófico derivado da glia (GDNF)**

Sabe-se que os fatores neurotróficos são proteínas secretadas que estabelecem o desenvolvimento, manutenção, emprego e plasticidade do sistema nervoso central. Destacam-se quatro das classes basillares de moléculas que abrangem a família dos fatores neurotróficos: a neurotrofina familiar, o fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF), as citocinas neurotróficas, e a família do fator neurotrófico da dopamina cerebral (CDNF) e, por fim, fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos (MANF) (ARON; KLEIN, 2011). De tal modo, alvitram que o GDNF exerce um papel efetivo no desenvolvimento do sistema nigroestriatal dopaminérgico, e que uma injúria neste sistema e redução dos níveis de GDNF pode afetar a sobrevivência dopaminérgica na vida adulta (SAAVEDRA *et al.*, 2008).

As técnicas imunohistoquímicas com anticorpos primários anti- GDNF são comumente empregadas. As técnicas adotam os protocolos do item anterior, sendo alterado apenas os anticorpos primários anti-GDNF (Ab119473- Abcam®), na diluição 1:200, de acordo com as instruções dos fabricantes.

#### **3.11.5 Alfa-sinucleína**

A acumulação de alfa-sinucleína na forma de agregados filamentosos intracelulares é uma das características patológicas das doenças neurodegenerativas denominadas por sinucleinopatias, nas quais se compreende a DP. Nesta doença, a proteína alfa-sinucleína na forma fibrilar é a principal componente dos corpos de Lewy, inclusões proteicas, intracitoplasmáticas. (GOEDERT, 2001). Alfa-sinucleína relaciona-se a ativação de células gliais uma vez

liberados no meio extracelular, contribuindo assim para a indução do processo neuroinflamatório característico da DP (BÉRAUD, MAGUIRE-ZAISS et al., 2012).

Para realização da imunohistoquímicas com anticorpos primários são comumente empregadas. As técnicas adotam os protocolos do item anterior, sendo alterado apenas os anticorpos primários Anti-alpha-sinucleína (Ab138501-Abcam®), na diluição 1:200, de acordo com as instruções dos fabricantes.

### **3.11.6 Receptor de VD (VDR)**

A atividade da VD depende de sua ligação ao receptor da VD, VDR, que codificam o fator de transcrição nuclear, e a formação do complexo entre a VD ativa (1,25 OH di-hidroxi-vitamina D) e o seu receptor, e desta forma afeta a expressão de mais de 1000 genes (MOHRI et al., 2009).

Devido sua natureza pleitrópica a VD tem capacidade de regular a expressão de centenas de genes através de mecanismos genéticos e ambientais tendo, deste modo, as alterações epigenéticas relacionadas a hipovitaminose D apresentam um papel significativo com na relação da VD com a doença de Parkinson. Atualmente polimorfismos nos genes VDR tem sido alvo de múltiplas pesquisas que visam relacionar tais alterações com a DP (KANG et al., 2016; PETERSON et al., 2014; WANG et al., 2015).

Para realização da imunohistoquímicas com anticorpos primários são comumente empregadas. As técnicas adotam os protocolos do item anterior, sendo alterado apenas os anticorpos primários Anti-receptor de VD (SAB 45030702-sigma®), na diluição 1:200, de acordo com as instruções dos fabricantes.

### **3.12 Aquisição de Imagens, Densidade Óptica (DO)**

Após a imunohistoquímica e montagem das lâminas, as secções foram fotografadas por microscópio de iluminação de campo claro (Nikon Microscope, H550S) com câmera digital (DXM-1200, Nikon) adjacente ao microscópio e a um programa de computador exclusivo para esse escopo. Para a análise da DO as imagens foram adquiridas, submetidas a uma mesma intensidade de luz, sem obter

por nenhuma alteração de brilho e contraste, assim, os valores em pixels achados nas imagens obedeceram a uma intensidade maior ou menor de marcação de determinada substância do tecido analisado.

As imagens analisadas foram constituintes por áreas em aumento de 10x, 20x nas quais foram plausíveis a visualização em detalhes da compleição ou deficiência de células imunorreativas nos tecidos. O quantitativo de células foi efetivado pelo software ImageJ (versão 1.6.0, *National Institutes of Health, USA*). Foram analisadas 4 secções do cérebro de cada animal e o número de células mensurado correspondeu à média de células em 4 secções analisadas. As áreas analisadas foram, corpo estriado (CE), região delimitadas com base no atlas de Paxinos e Watson (2007). O valor final da DO de cada grupo incide de uma média das DOs de cada animal.

#### **4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas foram realizadas com o Software GraphPad Prism® 6.01 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, E.U.A.*) e todos os dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Os dados não paramétricos foram avaliados através do teste de *Kruskal-Wallis* seguido do teste post-hoc de *Dunn's*, enquanto, os dados paramétricos foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post-hoc de Tukey* para comparações múltiplas. Em todas as análises, foram consideradas, estatisticamente significantes, valores de  $p < 0,05$ .

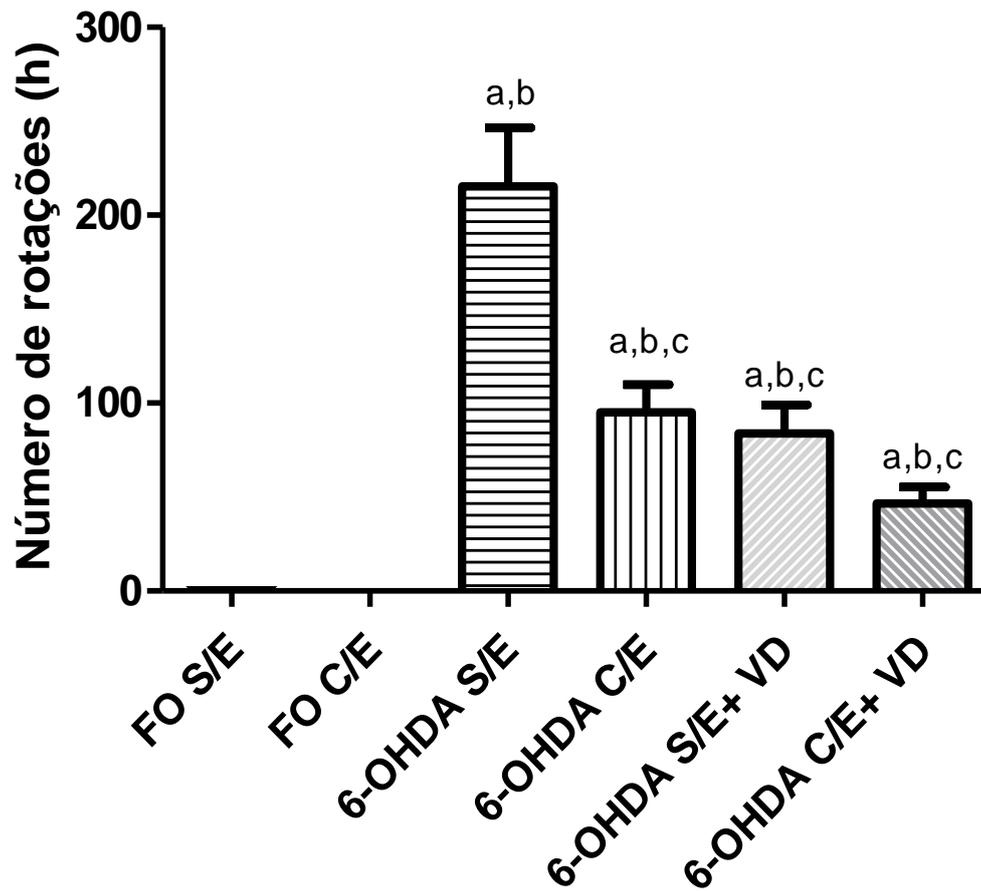
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Resultados de comportamento locomotor e memória em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

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

Após a injeção intraestriatal de 6-OHDA e aplicação dos protocolos de tratamento, foi administrada apomorfina (3mg/kg, i.p.), um agonista dopaminérgico que acarreta rotações contrárias à lesão (rotação contralateral). Destaca-se que quase não foi observado comportamento rotacional no grupo FO sem exercício ( $0,27 \pm 0,14$  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 ( $215,4 \pm 31,31$  rotações/h), o que foi em grande parte revertido nos grupos, 6-OHDA com exercício ( $95,17 \pm 14,63$  rotações/h), 6-OHDA com VD ( $83,78 \pm 15,30$  rotações/h) e 6-OHDA com exercício e suplementação com VD ( $46,62 \pm 8,71$  rotações/h). Evidencia-se, que o exercício físico como a associação da suplementação com VD, foi capaz de reduzir expressivamente as rotações induzidas por apomorfina decorrentes da lesão estriatal com 6-OHDA (Figura 30).

**Figura 30** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre o comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

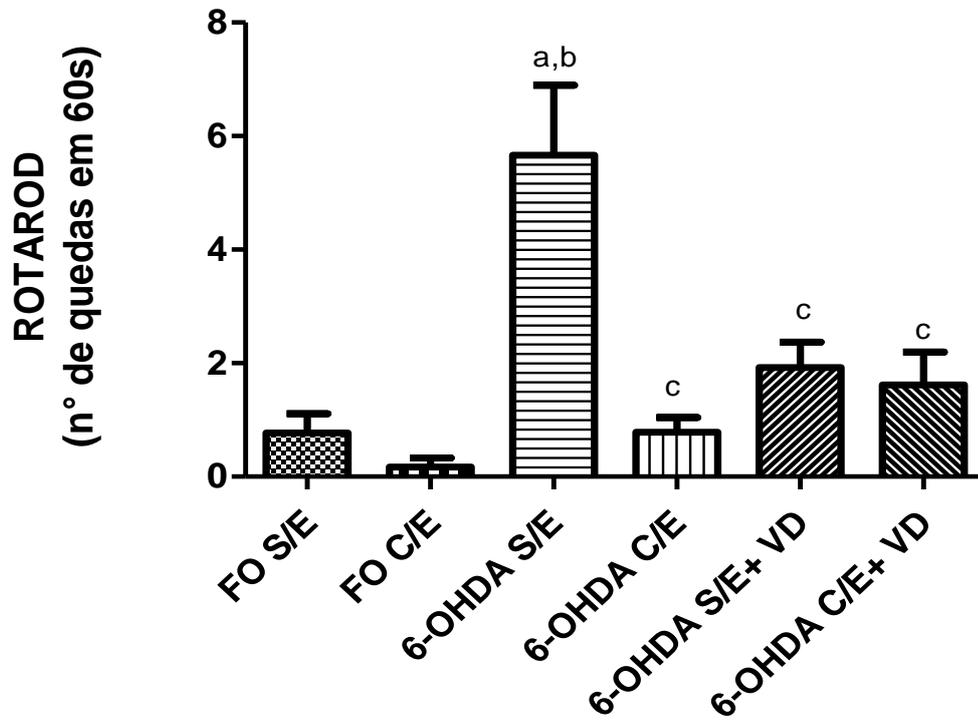


As barras representam o número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina (3 mg/kg, i.p.) determinadas em 1 h. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs FO S/E,  $p < 0,001$ ; b vs FO C/E,  $p < 0,001$ ; c vs 6-OHDA S/E,  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis e Dunn's).

### **5.1. 2 Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre atividade locomotora no teste *rotarod* em ratos lesionados com 6-OHDA**

Na avaliação do *rotarod*, foi analisada a atividade de coordenação motora, verificando o número de quedas em 60 segundos. O grupo 6-OHDA sem exercício apresentou aumento no número de quedas ( $5,66 \pm 1,23$  quedas/s), quando comparado aos grupos, FO sem exercício ( $0,76 \pm 0,34$ ) e FO com exercício ( $0,16 \pm 0,16$ ). Este efeito foi revertido no grupo 6-OHDA com exercício ( $0,78 \pm 0,26$  quedas/s), 6-OHDA sem com VD ( $1,92 \pm 0,44$  quedas/s) e 6-OHDA com exercício e VD ( $1,61 \pm 0,58$  quedas/s) (Figura 16). Os resultados evidenciaram que tanto o exercício físico como a suplementação com VD, sozinhos ou em associação, foram capazes reverter, no *rotarod*, as injúrias ocasionadas pela injeção de 6-OHDA (Figura 31).

**Figura 31** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre atividade locomotora avaliada no teste *rotarod*, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



As barras representam o número n° de quedas em 60s. Os valores estão representados como média ± EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs FO S/E,  $p < 0,001$ ; b vs FO C/E,  $p < 0,001$ ; c vs 6-OHDA S/E  $p < 0,05$  (One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

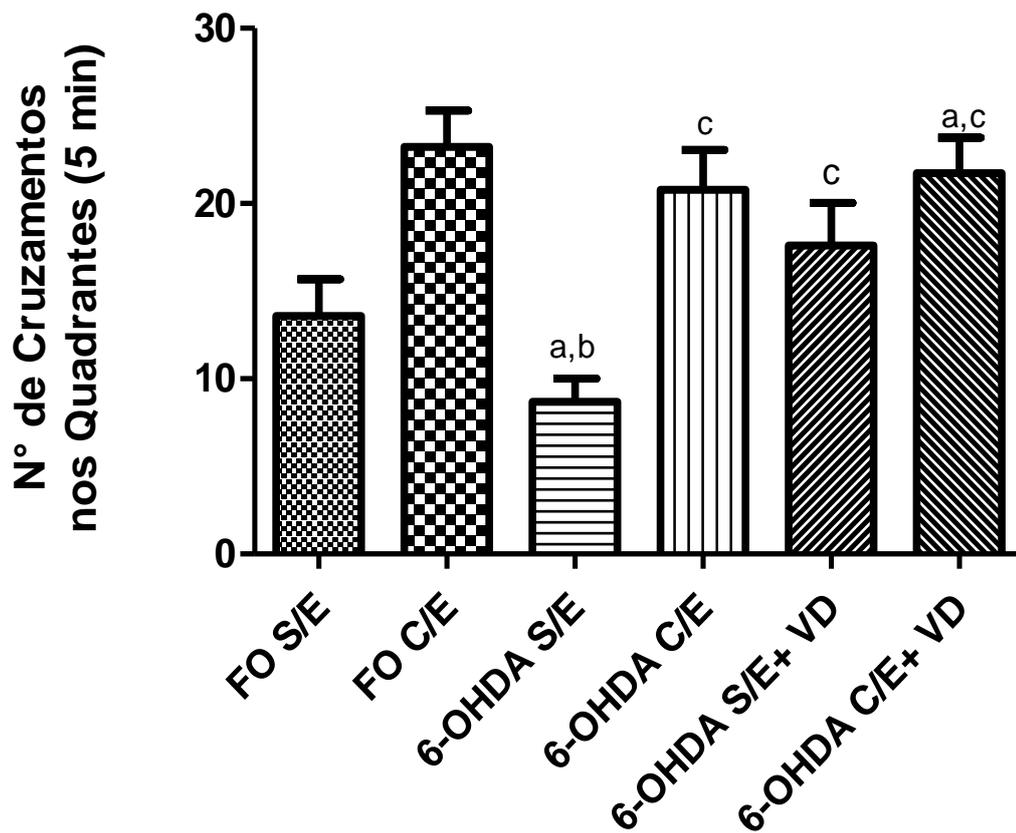
### 5.1.3 Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre o teste campo aberto (número de cruzamentos, *grooming* e *rearing*) em ratos lesionados com 6-OHDA

No teste campo aberto, no parâmetro da atividade locomotora, foi considerado o quantitativo de cruzamentos nos quadrantes, no decurso de cinco minutos. O grupo lesionado com 6-OHDA sem exercício, apresentou uma redução no número de cruzamentos ( $8,68 \pm 1,34$ ), quando comparado aos grupos, FO sem exercício ( $13,58 \pm 2,11$ ) e FO com exercício ( $23,25 \pm 2,07$ ). Entretanto, destaca-se uma resposta significativa nos grupos de tratamento, 6-OHDA com exercício ( $20,78 \pm 2,28$ ), grupo 6-OHDA com VD ( $17,60 \pm 2,44$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $21,74 \pm 2,01$ ) (Figura 32).

Com relação à atividade exploratória vertical (*rearing*), o grupo 6-OHDA sem exercício apresentou uma redução na frequência de *rearing* ( $3,05 \pm 0,84$ ), quando comparados ao grupo FO com exercício ( $15,79 \pm 1,49$ ). Contudo, este efeito foi revertido no grupo 6-OHDA com exercício, ( $13,25 \pm 1,39$ ), 6-OHDA com VD ( $6,15 \pm 1,13$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $13,52 \pm 1,97$ ), alcançando-se efeitos próximos ao grupo FO com exercício. Torna-se importante destacar que os grupos submetidos ao treinamento de exercício em esteira exibiram maior exploração vertical do ambiente (Figura 33).

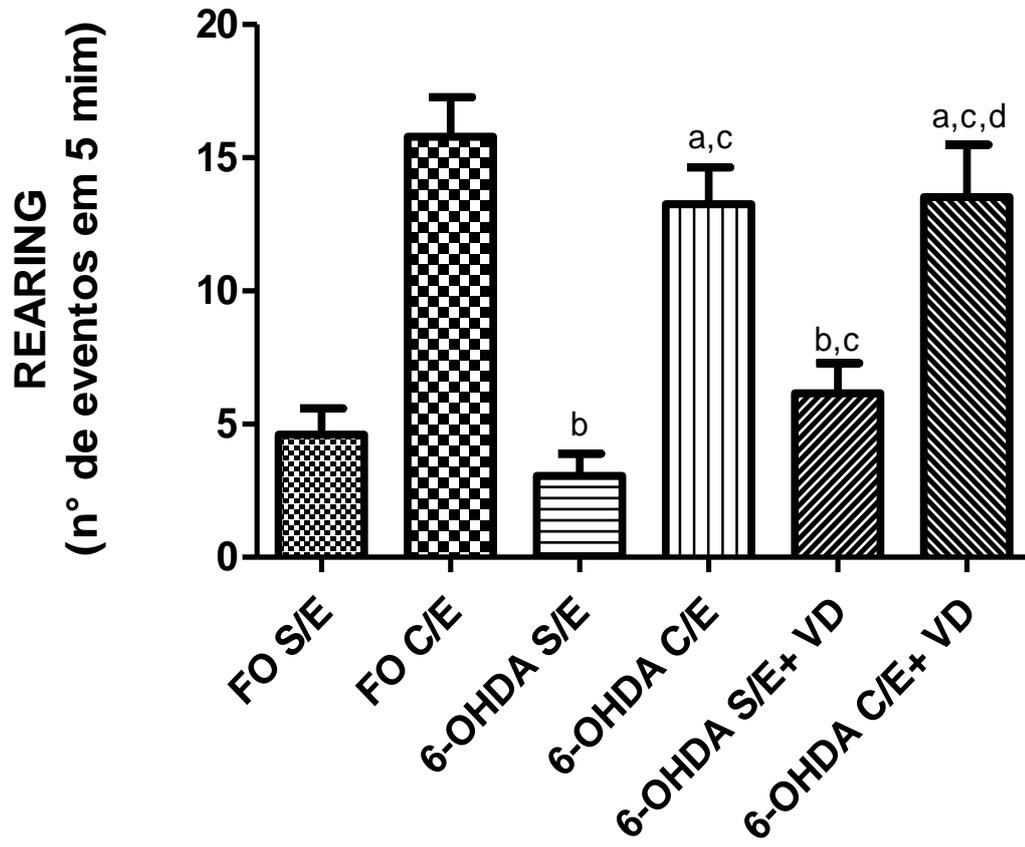
Quanto à avaliação de autolimpeza (*grooming*), o grupo 6-OHDA sem exercício ( $3,22 \pm 0,45$ ) demonstrou um aumento no número de eventos em relação aos grupos, FO sem exercício ( $1,63 \pm 0,46$ ) e FO com exercício ( $1,30 \pm 0,27$ ). No entanto, os grupos 6-OHDA com exercício físico ( $1,40 \pm 0,31$ ), 6-OHDA com VD ( $1,18 \pm 0,30$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $1,35 \pm 0,35$ ), averiguou-se uma redução desta conduta (Figura 34).

**Figura 32** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD no comportamento exploratório horizontal (número de cruzamentos), avaliado no teste campo aberto em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



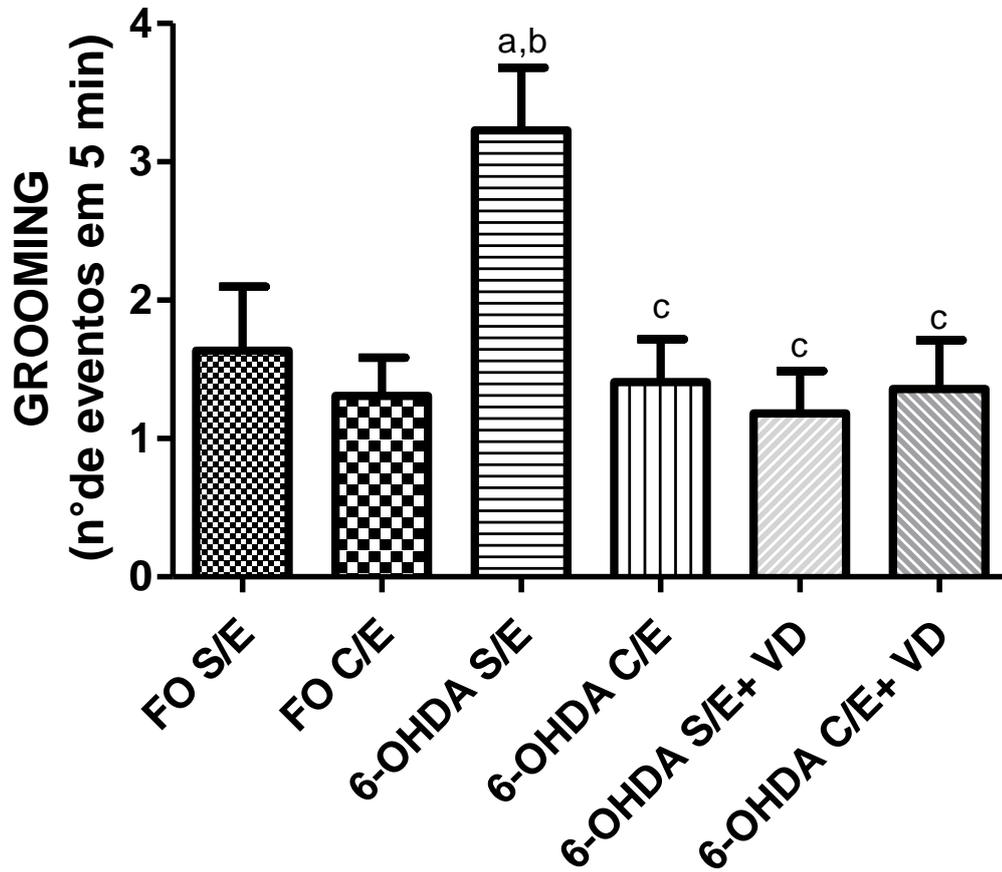
As barras representam o número de cruzamentos nos quadrantes no campo aberto, em 5min. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs FO S/E,  $p < 0,001$ ; b vs FO C/E,  $p < 0,001$ ; c vs 6-OHDA S/E  $p < 0,05$  (One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

**Figura 33** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD no comportamento exploratório vertical (*rearing*), avaliado no teste campo aberto, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



As barras indicam o número de levantamentos pelos animais no campo aberto, em 5 min. Foram utilizados de 18 a 23 animais por grupo. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO S/E,  $p < 0,001$ ; b vs FO C/E,  $p < 0,001$ ; c vs 6-OHDA S/E,  $p < 0,001$ ; d vs 6-OHDA S/E + VD,  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis e Dunn's).

**Figura 34** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD no comportamento *grooming*, avaliada no teste campo aberto, em rato com lesão unilateral por 6-OHDA



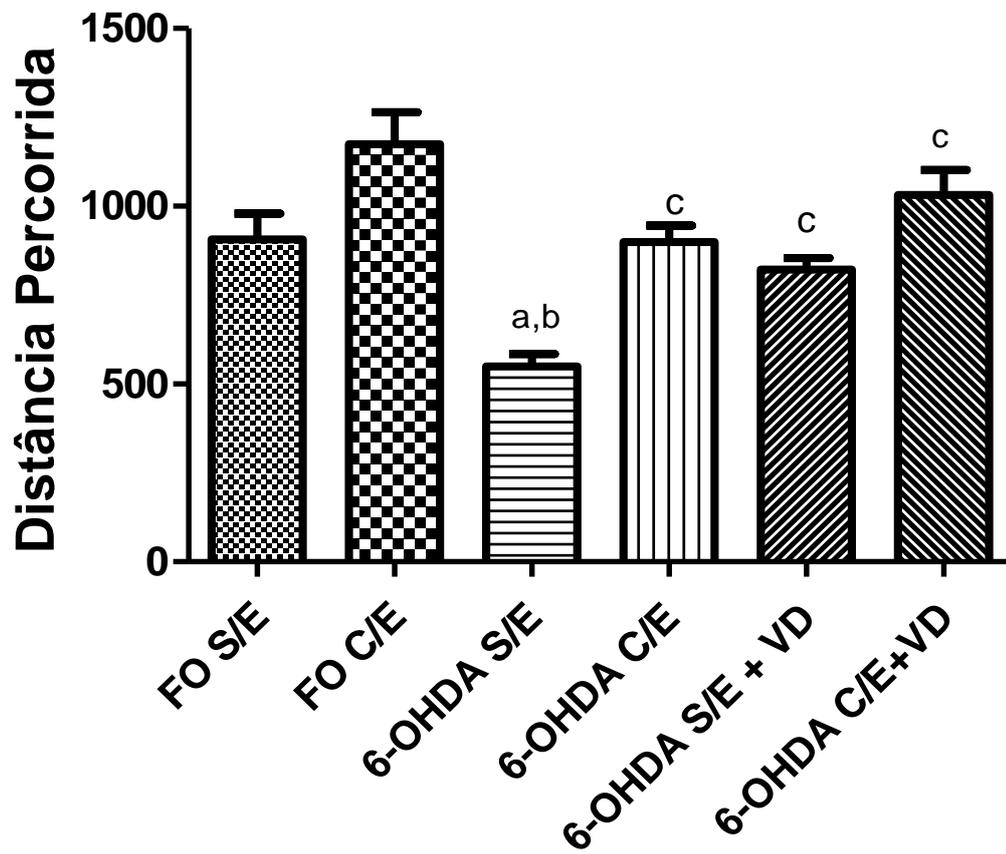
As barras indicam o número *grooming* pelos animais no campo aberto, em 5 min. Foram utilizados de 18 a 23 animais por grupo. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E),  $p < 0,01$ , b. vs FO com exercício (C/E)  $p < 0,01$  e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis e Dunn's).

#### **5.1.4 Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre o teste de distância percorrida no campo aberto**

Para análise da distância percorrida, utilizou-se o *software SMART v3.0 (Panlab Harvard Apparatus, USA)*, que fornece dados numéricos e imagens sobre a distância percorrida por cada animal no momento de realização do teste campo aberto (Figura 35 e 36).

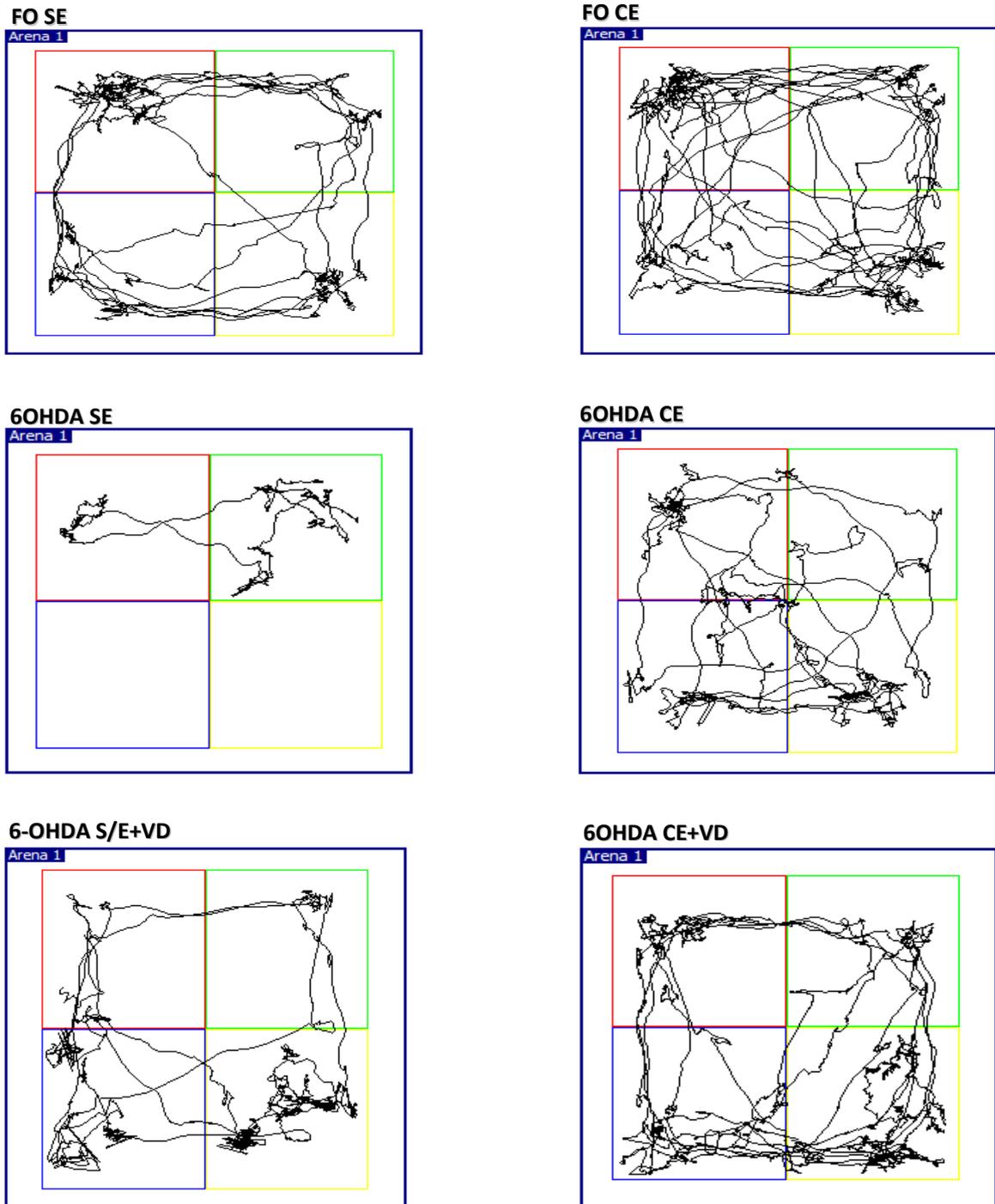
Deste modo, verificou-se que o grupo lesionado com 6-OHDA sem exercício físico apresentou um percurso inferior ( $549,1 \pm 34,82$ ), quando comparado aos grupos, FO sem exercício ( $906,3 \pm 73,43$ ) e FO com exercício ( $1174 \pm 90,25$ ). Ainda, destaca-se uma resposta significativa nos grupos de tratamento, 6-OHDA com exercício ( $899,0 \pm 46,60$ ), 6-OHDA com VD ( $821,5 \pm 33,01$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $1032 \pm 69,67$ ) (Figura 35).

**Figura 35** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre a avaliação da distância percorrida, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



As barras indicam a distância percorrida pelos animais no campo aberto, em 5 min. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs FO S/E,  $p < 0,05$ ; b. vs FO C/E,  $p < 0,05$ ; c. vs 6-OHDA S/E,  $p < 0,05$  (One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

**Figura 36** – Imagens da trajetória percorrida durante o teste campo aberto em animais submetidos ao modelo de 6-OHDA



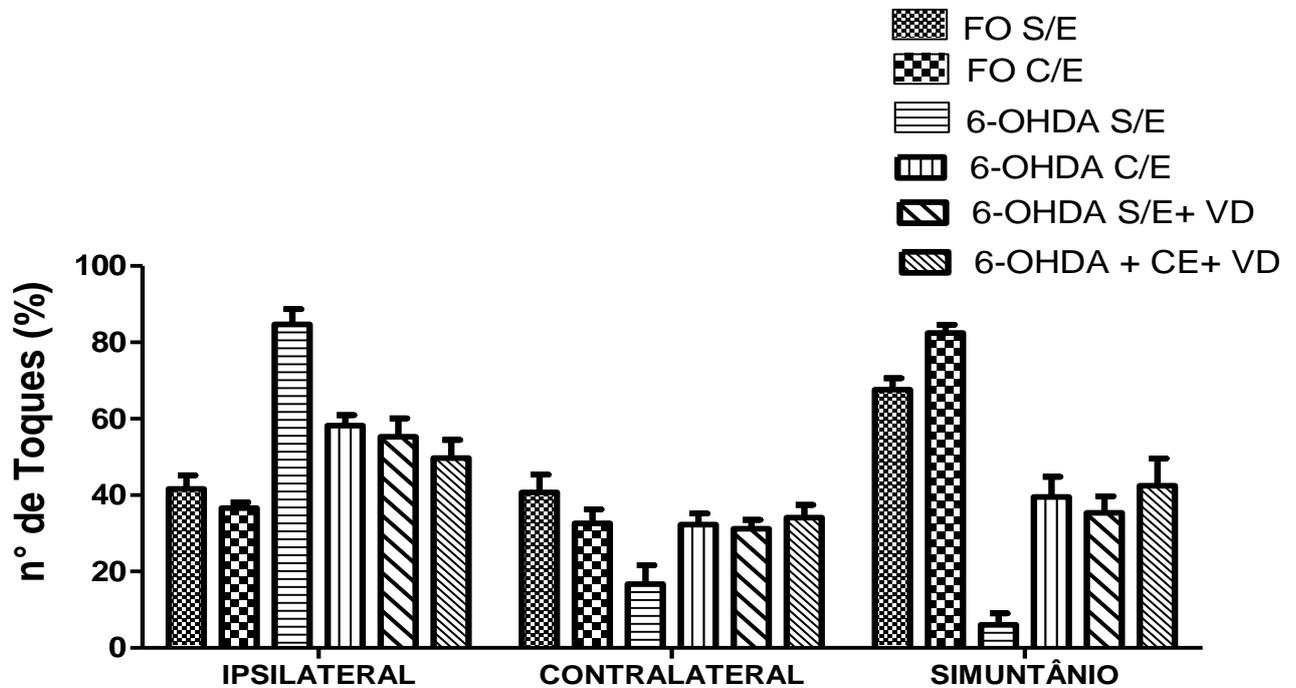
Imagens representativas da distância percorrida entre os grupos experimentais utilizando softwaree SMART v3.0 (Panlab Harvard Apparatus). Fonte: Dados da pesquisa.

### **5.1.5 Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre a avaliação do Cilindro, em ratos lesionados com 6-OHDA**

Na avaliação do cilindro, ponderamos a atividade motora fina através do percentual de vezes em que o animal, durante a atividade exploratória vertical (*rearing*), toca a parede do cilindro com as patas dianteiras; ipsilateral a lesão (PI), contralateral (PC) a lesão e ambas as patas simultaneamente (PS).

Neste teste não foi observado uma diferença estatística entre os grupos avaliados, FO sem exercício ( $50,00 \pm 8,82$ ), FO com exercício ( $50,57 \pm 15,98$ ), 6-OHDA, sem exercício ( $35,84 \pm 24,65$ ), 6-OHDA com exercício ( $43,34 \pm 7,71$ ), 6-OHDA com VD ( $40,61 \pm 7,42$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $42,12 \pm 4,49$ ) (Figura 37).

**Figura 37** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre a avaliação do cilindro, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

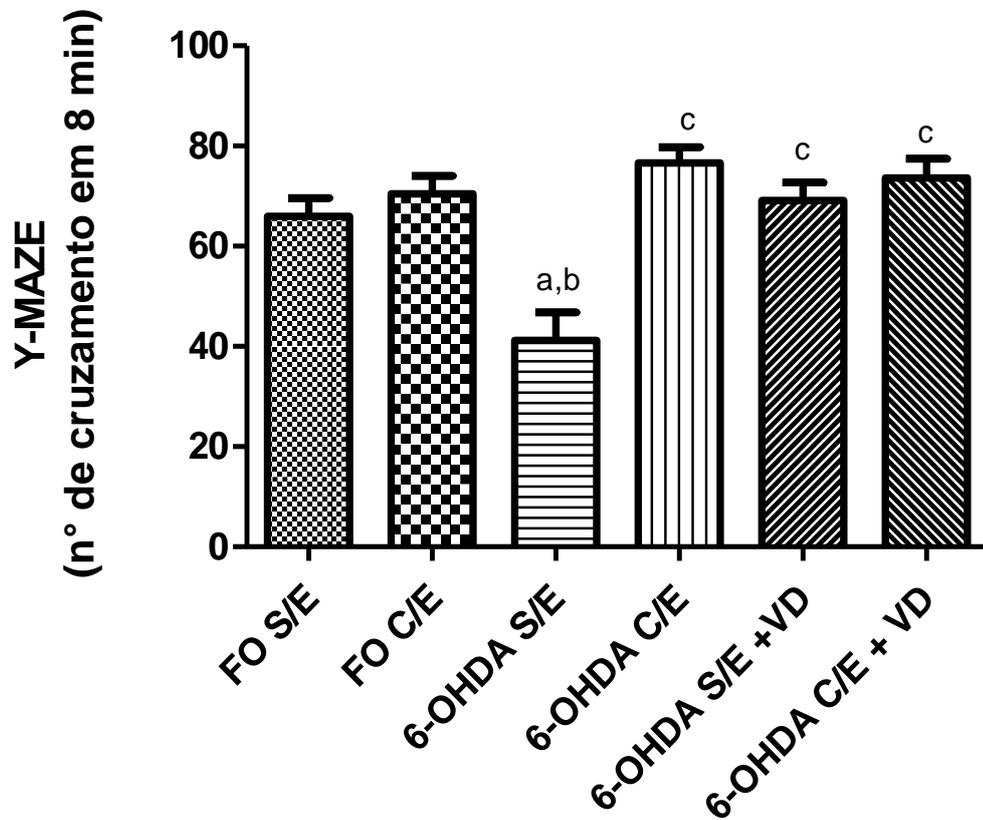


As barras representam a percentagem de toques ipsilateral, contralateral e com ambas as patas dos membros anteriores, pelos animais no Teste do Cilindro, em 5 min. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM, no entanto não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre os grupos,  $p > 0,05$  (One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

### **5.1.6 Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre a memória operacional, *Y-maze* em ratos lesionados com 6-OHDA**

O *Y-maze* é uma avaliação que se relaciona com a memória de trabalho ou memória operacional. As injúrias decorrentes da lesão estriatal na performance dos ratos se apresentam na Figura 38. Os dados são apresentados como número de cruzamentos efetuados em 8 min. O grupo 6-OHDA sem exercício físico exibiu uma redução na percentualidade de alterações espontâneas no labirinto em Y ( $41,18 \pm 5,64$ ), quando relacionado com os grupos, FO sem exercício físico ( $65,96 \pm 3,66$ ) e FO com exercício ( $70,46 \pm 3,56$ ). No grupo 6-OHDA com exercício, ( $76,66 \pm 3,15$ ), 6-OHDA com VD ( $69,10 \pm 3,57$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $73,66 \pm 3,78$ ), foi possível perceber uma resposta positiva em relação ao grupo 6-OHDA sem exercício. Os achados evidenciam uma resposta similar dos grupos de tratamento aos FO.

**Figura 38** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre a avaliação de memória operacional, no teste Y-maze, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

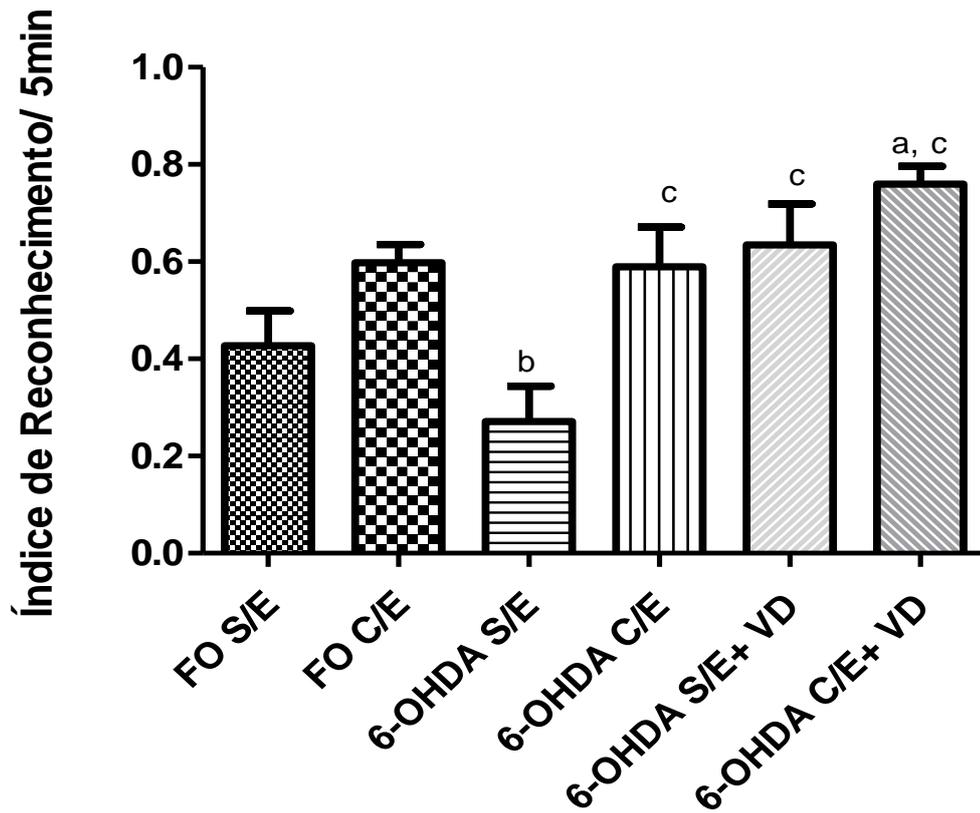


As barras representam a percentagem de alterações espontâneas corretas no Teste do Labirinto em Y, em 8 min. Foram utilizados de 16 a 18 animais por grupo. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0,05$ , b. vs FO com exercício (C/E)  $p < 0,05$  e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis e Dunn's).

### **5.1.7 Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD no comportamento reconhecimento de objeto em ratos lesionados com 6-OHDA**

No teste reconhecimento de objeto, avaliou-se a memória de curto prazo em um período de 5 minutos. Os efeitos da lesão estriatal no desempenho dos ratos estão apresentados na Figura 39. O grupo 6-OHDA sem exercício físico ( $0,27 \pm 0,07$ ), apresentou uma redução na memória de curto prazo, quando comparado ao grupo, FO com exercício físico ( $0,59 \pm 0,03$ ). Entretanto, os grupos, 6-OHDA com exercício ( $0,59 \pm 0,08$ ), 6-OHDA com VD ( $0,63 \pm 0,08$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $0,76 \pm 0,03$ ), apresentaram um aumento significativo memória de curto prazo.

**Figura 39** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD no teste de reconhecimento de objeto, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



As barras indicam o índice de reconhecimento de objeto pelos animais, durante 5 min. Os valores estão representados como média ± EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO S/E,  $p < 0,05$ ; b vs FO C/E,  $p < 0,05$  c. vs 6-OHDA S/E  $p < 0,05$  (One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

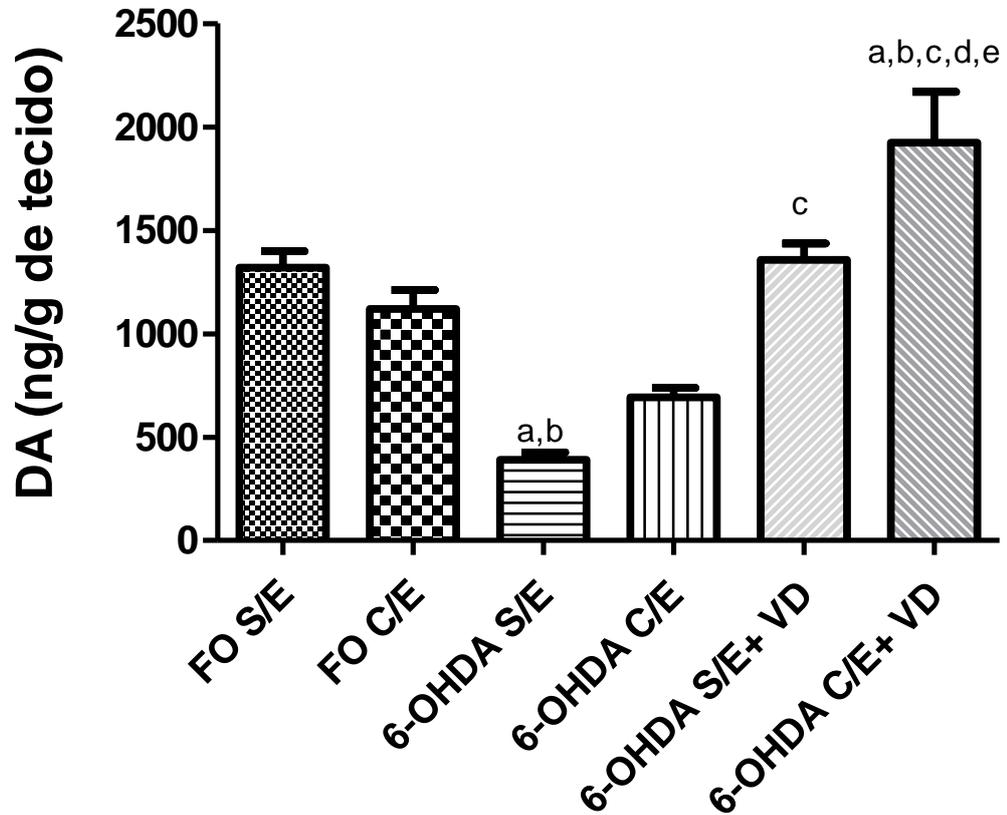
## **5.2 Resultados neuroquímicos em rato com lesão unilateral por 6-OHDA**

### **5.2.1 Determinação das concentrações de dopamina (DA) e seu metabólito DOPAC nos corpos estriados de ratos com lesão por 6-OHDA, submetidos ao protocolo de exercício físico esteira e suplementação com VD**

A injeção intraestriatal de 6-OHDA originou dano oxidativo, conseqüente da degradação do tecido e redução das concentrações de monoaminas demonstrados como ng/g de tecido. O grupo 6-OHDA sem exercício apresentou uma redução nas concentrações de DA ( $390,4 \pm 36,49$ ), quando comparado aos grupos FO sem exercício ( $1321 \pm 79,27$ ) e FO com exercício ( $1121 \pm 89,81$ ). Entretanto, essas injúrias foram revestidas nos grupos, 6-OHDA suplementado com VD ( $1356 \pm 79,27$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $19,23 \pm 245,7$ ). Não obtivemos resposta significativa no grupo 6-OHDA com exercício ( $692,3 \pm 45,48$ ) (Figuras 40).

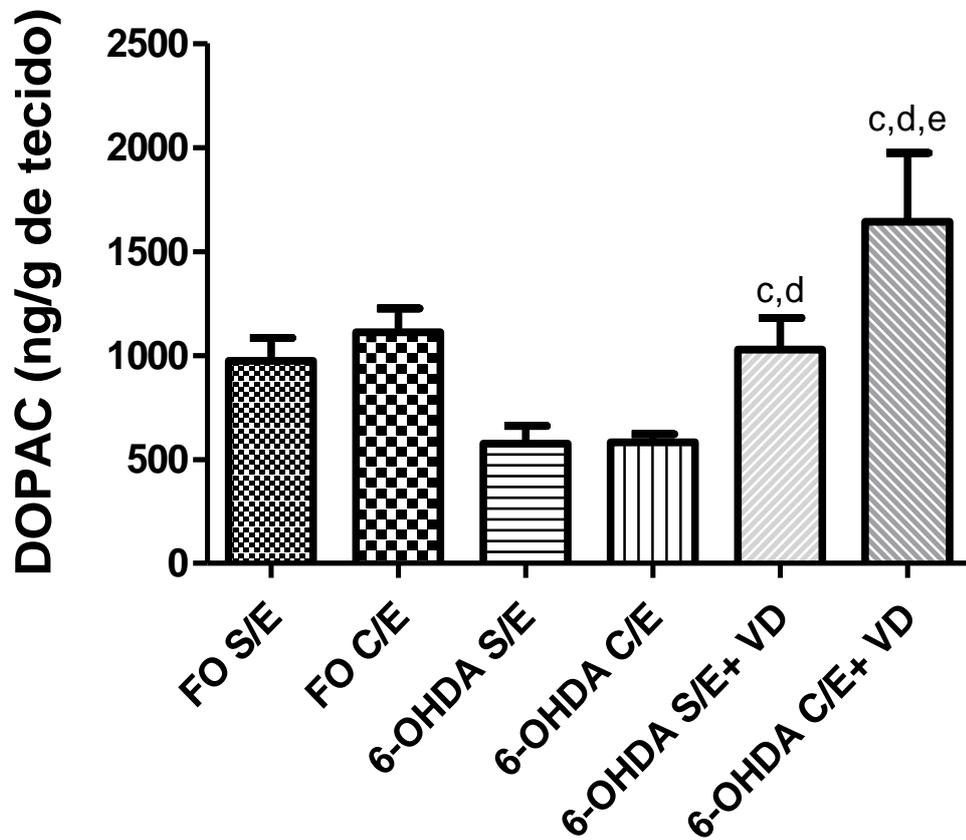
Quanto ao DOPAC, principal metabólito cerebral da DA, observou-se um aumento nos grupos, 6-OHDA sem exercício e VD ( $1028 \pm 152,5$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $1642 \pm 331,1$ ), quando comparados ao grupo 6-OHDA sem exercício ( $575,7 \pm 86,01$ ). Porém, destaca-se que quando comparado o grupo 6-OHDA sem exercício ( $575,7 \pm 86,01$ ), com os grupos, FO sem exercício ( $973,3 \pm 112,0$ ), FO com exercício ( $1111 \pm 115,9$ ) e 6-OHDA com exercício ( $582,0 \pm 40,45$ ), não obtivemos diferenças estatísticas (Figuras 41).

**Figura 40** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre as concentrações estriatais de DA, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



As barras representam as concentrações estriatais de DA em ng/g de tecido. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO S/E  $p < 0,05$ , b. vs FO C/E,  $p < 0,05$ , c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ ; d. vs 6-OHDA C/E,  $p < 0,05$ ; e 6-OHDA S/E +VD,  $p < 0,05$  (One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

**Figura 41** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre as concentrações estriatais de DOPAC, em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



As barras representam as concentrações estriatais de DOPAC em ng/g de tecido. As letras acima das barras indicam diferença significativa: c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ ; d. vs 6-OHDA C/E,  $p < 0,05$ ; e 6-OHDA S/E +VD,  $p < 0,05$  (One Way ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

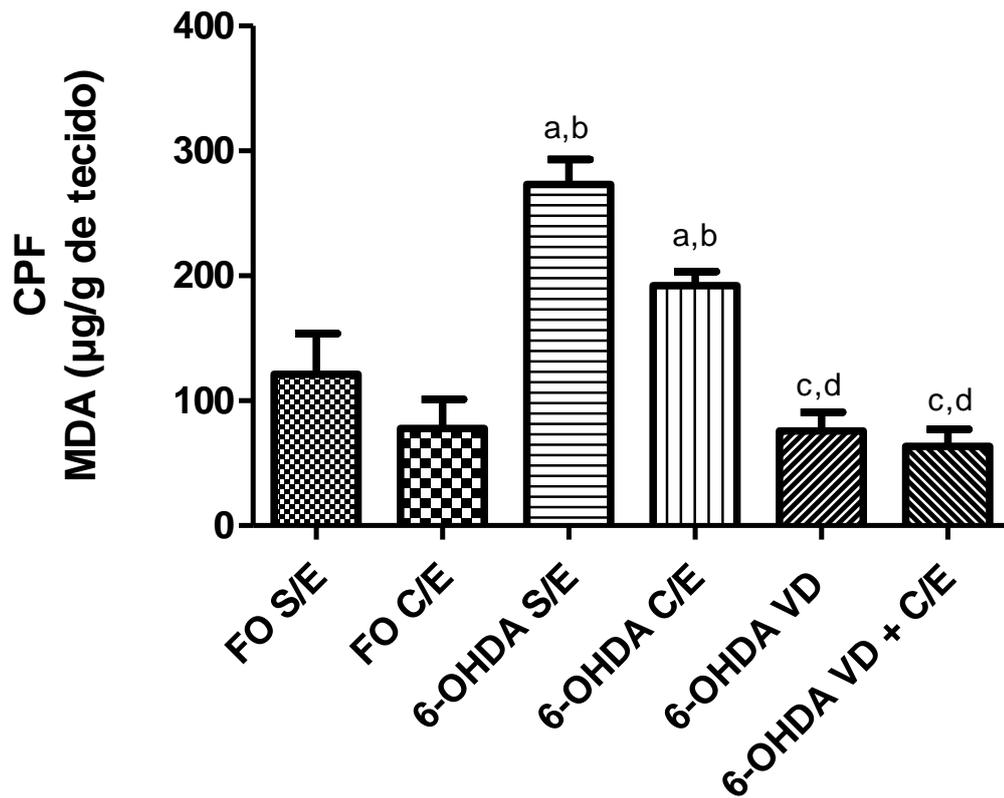
### **5.2.2 Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD na peroxidação lipídica (TBARS) em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado direito (CE) de ratos lesionados com 6-OHDA**

A peroxidação lipídica consiste em avaliar, por meio da determinação de TBARS ( $\mu\text{g MDA/g tecido}$ ), como objetivo de evidenciar a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA e as implicações do exercício físico e suplementação de VD sobre o estresse oxidativo. Ressalta-se um aumento de MDA na área do CPF, no grupo 6-OHDA sem exercício ( $273,2 \pm 19,83$ ), quando comparado aos grupos, FO sem exercício ( $121,2 \pm 32,56$ ) e FO com exercício ( $77,88 \pm 23,25$ ). O grupo 6-OHDA sem exercício com VD ( $75,93 \pm 14,95$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $63,45 \pm 13,56$ ) apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de MDA. Ressalta-se que no grupo, 6-OHDA com exercício ( $192,3 \pm 11,06$ ) não obtivemos diferenças significativas quando comparado ao grupo 6-OHDA sem exercício (Figuras 42). Contudo, torna-se relevante destacar que os grupos com suplementação de VD apresentaram uma redução estatisticamente expressiva, podendo aproximar-se dos FO.

Em relação à exposição das células do HC, no grupo 6-OHDA sem exercício, observou-se um aumento no conteúdo de MDA ( $253,7 \pm 29,34$ ), quando comparado com aos grupos, FO sem exercício ( $48,80 \pm 4,13$ ) e FO com exercício ( $179,3 \pm 9,20$ ). Os grupos, 6-OHDA com exercício ( $182,3 \pm 11,97$ ), 6-OHDA sem exercício com VD ( $60,13 \pm 7,76$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $47,21 \pm 4,19$ ) apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis de MDA (Figuras 43).

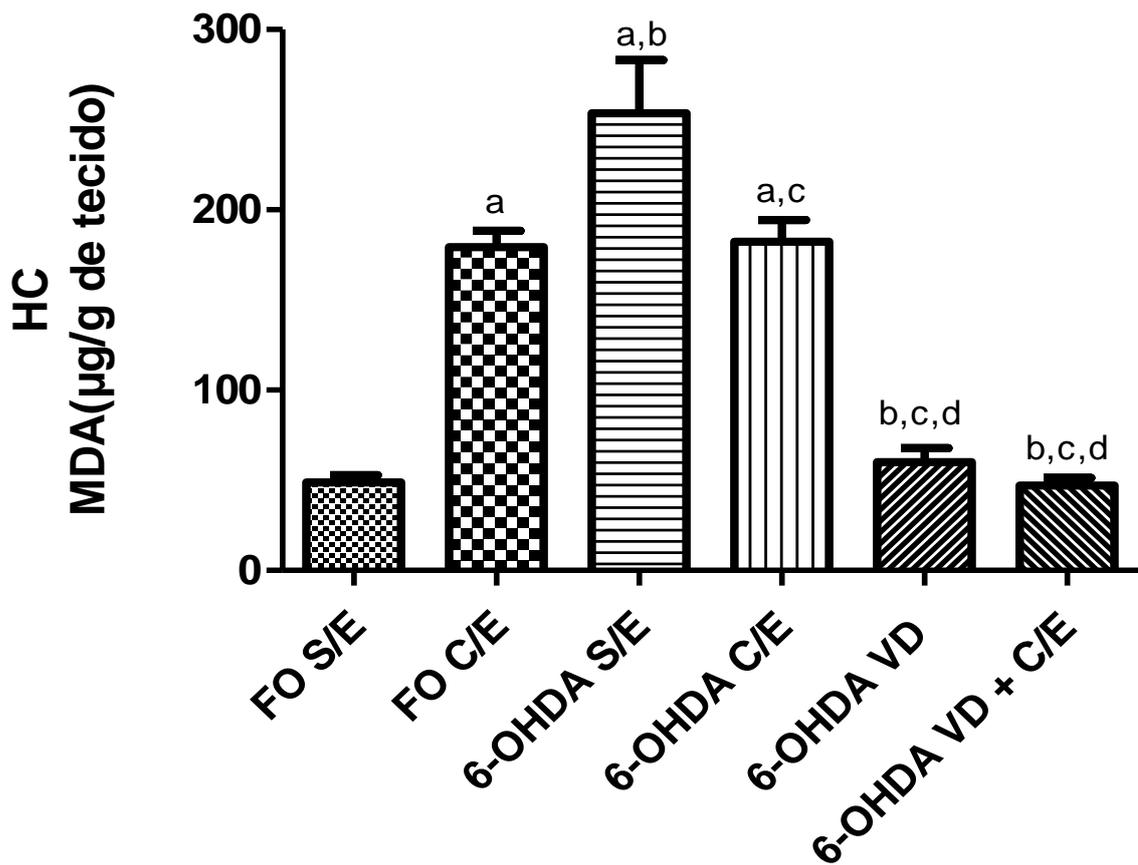
Quanto ao CE, no grupo 6-OHDA sem exercício ( $1660 \pm 183,9$ ), evidenciou um aumento no conteúdo de MDA, quando comparados aos grupos, FO sem exercício ( $1001 \pm 108,6$ ) e FO com exercício ( $1093 \pm 87,06$ ). Contudo, demonstraram-se expressivas reduções estatísticas nos grupos, 6-OHDA com exercício, ( $1079 \pm 92,87$ ), 6-OHDA sem exercício com VD ( $1241 \pm 106,6$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $135,7 \pm 12,59$ ) (Figura 44).

**Figura 42-** Efeito do exercício físico e suplementação com VD na peroxidação lipídica (TBARS) de córtex pré-frontal (CPF), em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



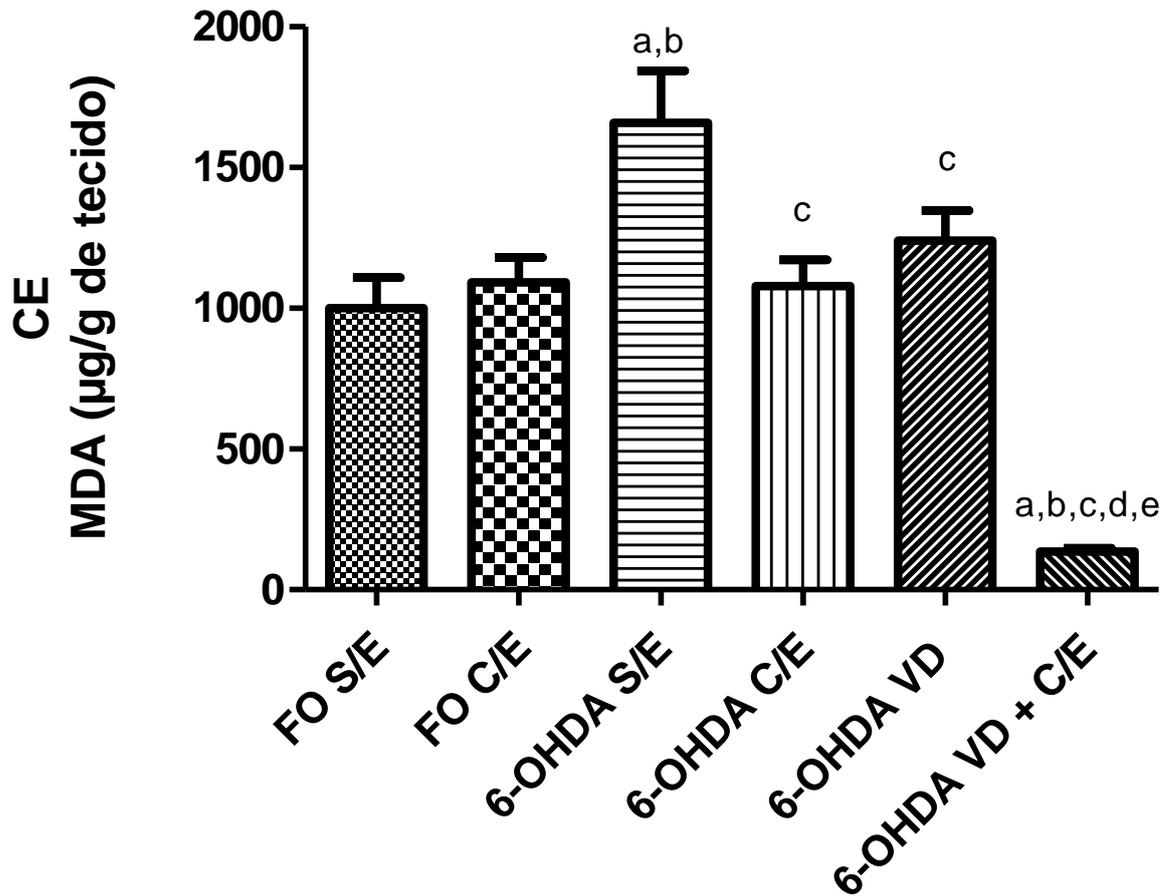
As barras representam as concentrações de MDA no CPF, em µg/g de tecido. Os valores estão representados como média ± EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0,05$ ; b FO com exercício (C/E),  $p < 0,05$ ; c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,05$ ; d 6-OHDA (C/E)  $p < 0,05$  (One Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

**Figura 43** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD na peroxidação lipídica (TBARS) em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



As barras representam as concentrações de MDA no HC, em µg/g de tecido. Os valores estão representados como média ± EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0,05$ ; b FO com exercício (C/E),  $p < 0,05$ ; c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,05$ ; d 6-OHDA C/E  $p < 0,05$  (One Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

**Figura 44** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD na peroxidação lipídica (TBARS) em corpo estriado esquerdo (CE)



As barras representam as concentrações de MDA no CE, em µg/g de tecido. Os valores estão representados como média ± EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0,05$ ; b FO com exercício (C/E),  $p < 0,05$ ; c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,05$ ; d 6-OHDA C/E  $p < 0,05$ ; e 6-OHDA +VD,  $p < 0,05$  (One Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

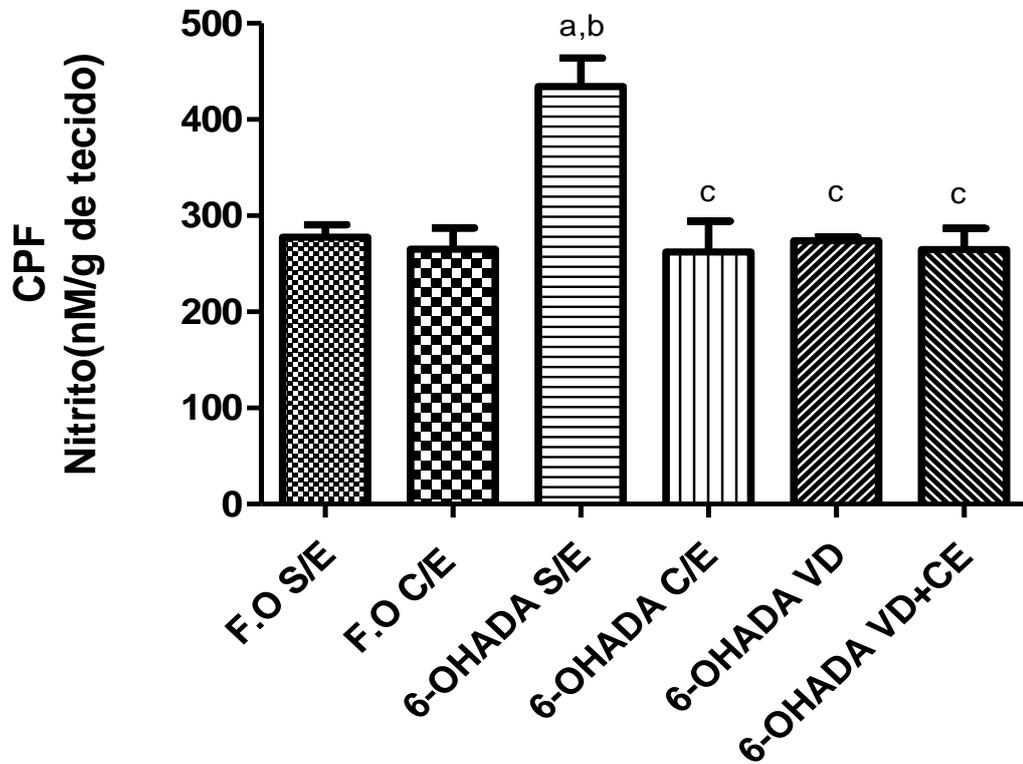
### **5.2.3 Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre dosagem de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) corpo estriado direito (CE) de ratos lesionados com 6-OHDA**

Os resultados demonstraram que as concentrações de nitrito/nitrato no grupo 6-OHDA sem exercício aumentaram no CPF ( $434,3 \pm 29,51$ ), quando comparado aos grupos, FO sem exercício ( $277,8 \pm 12,89$ ) e FO com exercício ( $265,3 \pm 21,86$ ). Contudo, o grupo 6-OHDA com exercício ( $262,1 \pm 32,27$ ), 6-OHDA sem exercício com VD ( $273,9 \pm 3,84$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $265,0 \pm 21,72$ ) exibiram um arrefecimento significativo nas concentrações de nitrito/nitrato após aplicação do protocolo de exercício e suplementação com VD (Figuras 45).

Quanto ao HC, observou-se um aumento nas concentrações de nitrito/nitrato no grupo 6-OHDA sem exercício ( $411,4 \pm 27,43$ ), quando correlacionado aos grupos, FO sem exercício ( $309,8 \pm 16,24$ ) e FO com exercício ( $296,6 \pm 14,79$ ). Entretanto, evidenciamos uma expressiva redução nos grupos, 6-OHDA com exercício ( $307,9 \pm 15,00$ ), 6-OHDA sem exercício e VD ( $294,4 \pm 11,23$ ) e grupo 6-OHDA com exercício e VD ( $266,0 \pm 25,55$ ) (Figura 46).

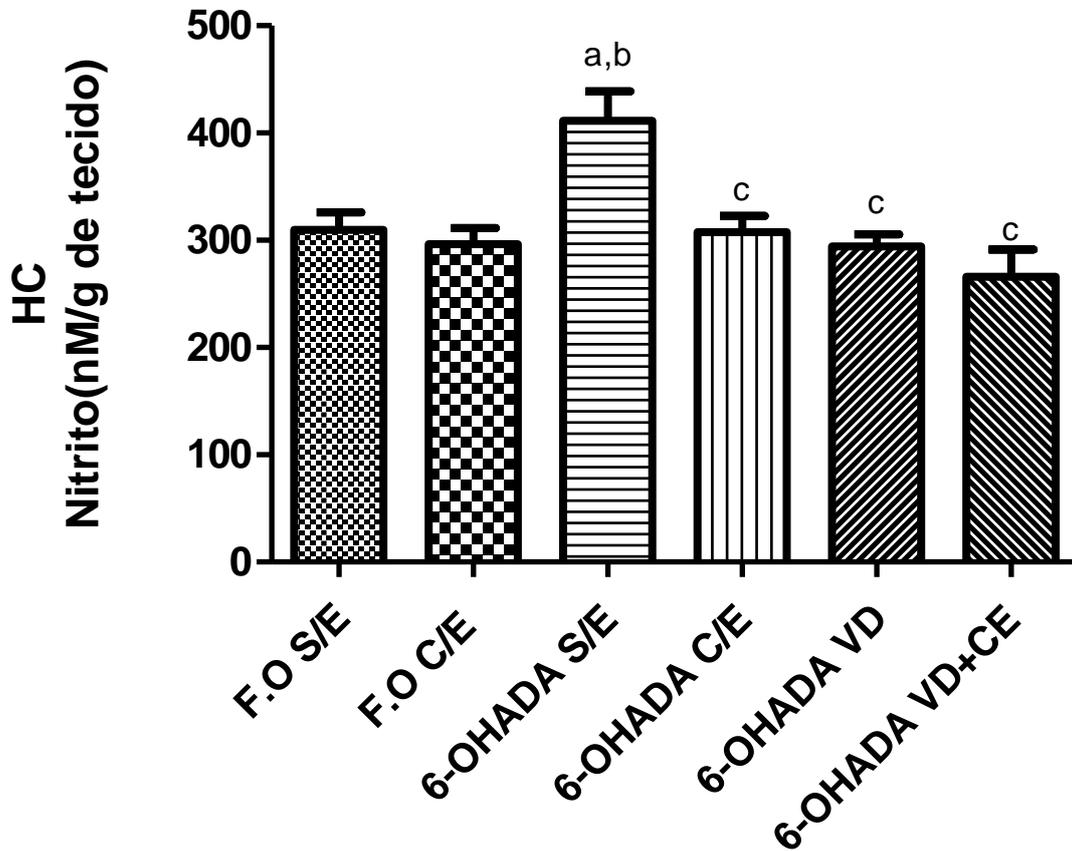
Em relação ao CE, as concentrações de nitrito/nitrato no grupo 6-OHDA sem exercício apresentou um aumento ( $424,1 \pm 15,55$ ), quando comparado aos grupos, FO sem exercício ( $279,1 \pm 17,98$ ) e FO com exercício ( $264,4 \pm 23,95$ ). No entanto, o grupo 6-OHDA com exercício ( $283,7 \pm 23,32$ ), 6-OHDA sem exercício e VD ( $296,4 \pm 18,96$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $287,2 \pm 18,90$ ), ocorreu uma redução destas concentrações (Figura 47).

**Figura 45** – Efeito do exercício físico e suplementação de VD sobre dosagem de nitrito/nitrato em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



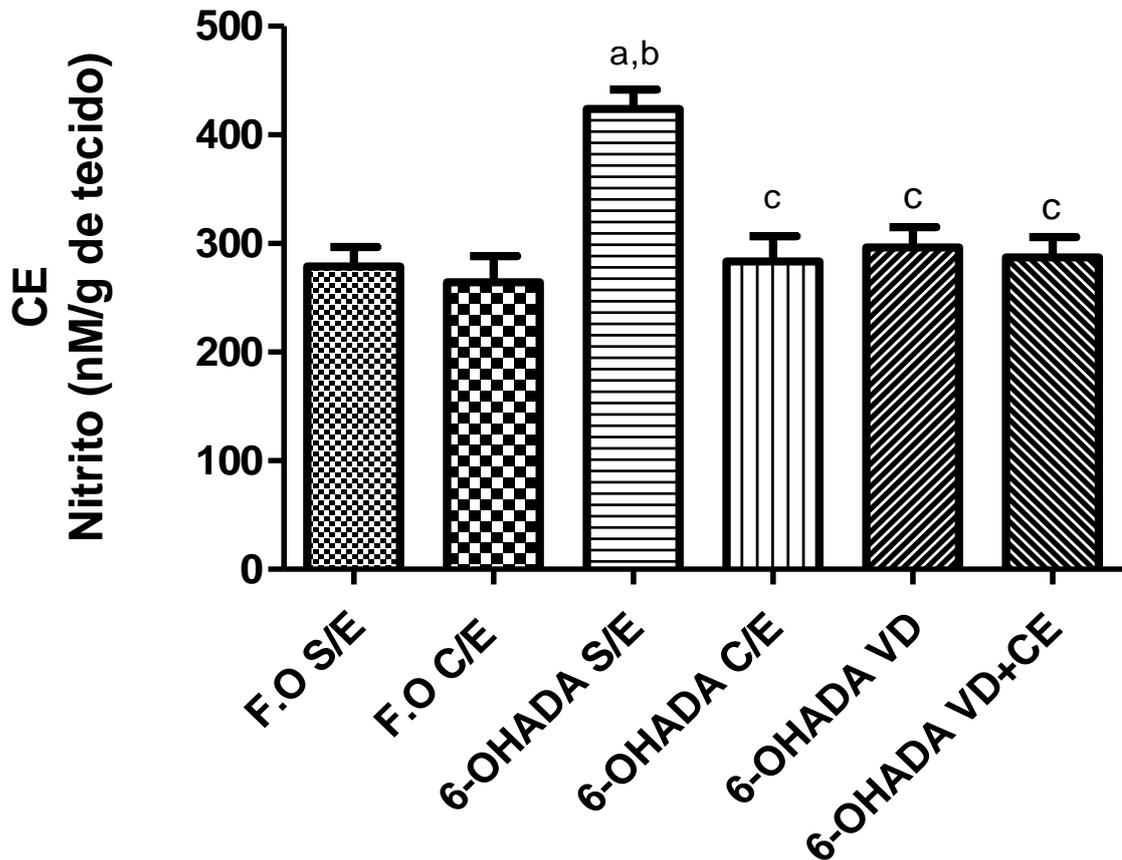
As barras representam os níveis de nitrito/nitrato no CPF, em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0.05$ , b. vs FO com exercício (C/E)  $p < 0,05$  e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,05$  (One Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

**Figura 46** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre dosagem de nitrito/nitrato em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



As barras representam os níveis de nitrito/nitrato no HC, em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0,05$ , b. vs FO com exercício (C/E)  $p < 0,05$  e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,05$  (One Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

**Figura 47** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre dosagem de nitrito/nitrato em corpo estriado direito (CE) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



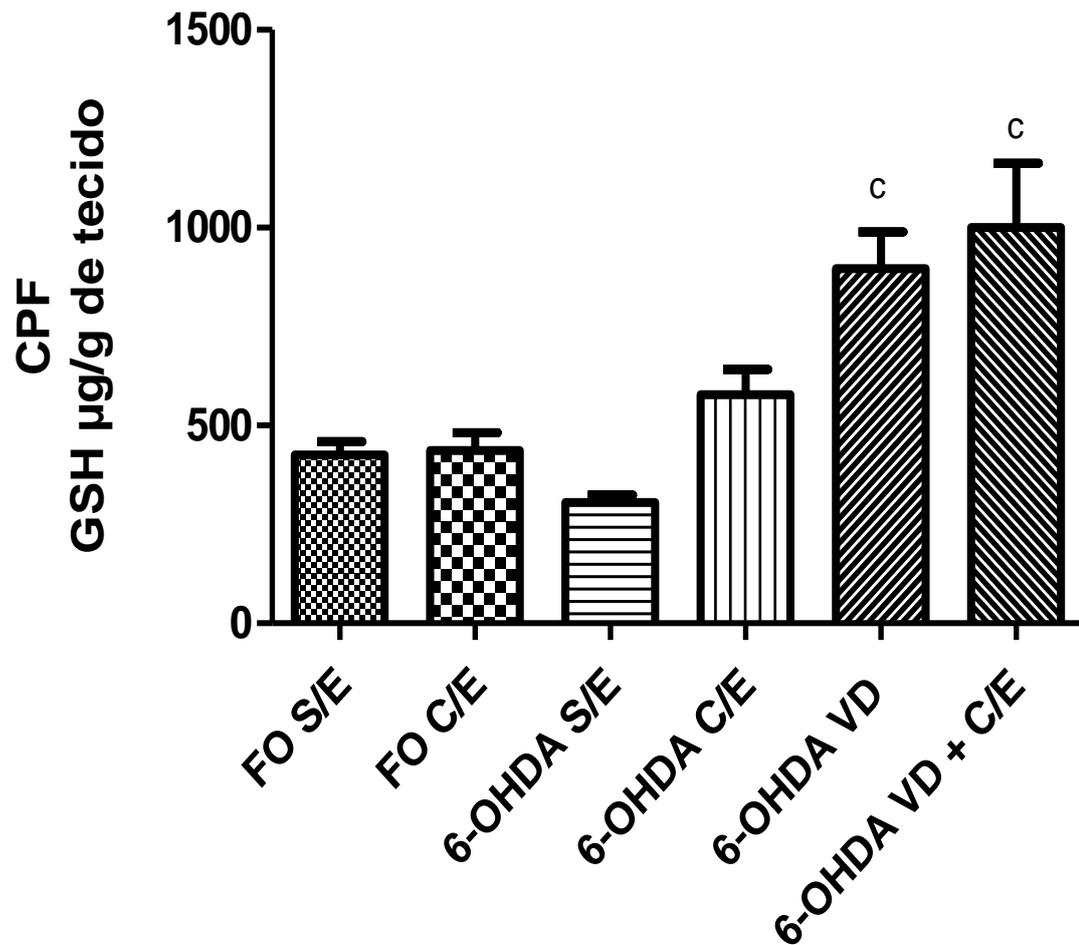
As barras representam os níveis de nitrito/nitrato no CE, em  $\mu\text{mol/g}$  de tecido. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0.05$ , b. vs FO com exercício (C/E)  $p < 0.05$  e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0.05$  (One Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

#### **5.2.4 Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), de ratos lesionados com 6-OHDA**

A glutathiona, um tripeptídeo (g-L-glutamil-cisteinil-glicina), permanece no organismo nas conformações de GSH e GSSG, operando de modo direto nos processos biológicos do organismo humano, envolvendo metabolismo bem como proteção das células. Neste contexto, os achados demonstraram que as concentrações de GSH apresentaram um aumento na área do CPF nos grupos, 6-OHDA sem exercício com VD ( $896,4 \pm 92,61$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $1001 \pm 162,6$ ), quando comparado ao 6-OHDA sem exercício ( $306,0 \pm 18,50$ ) (Figura 48).

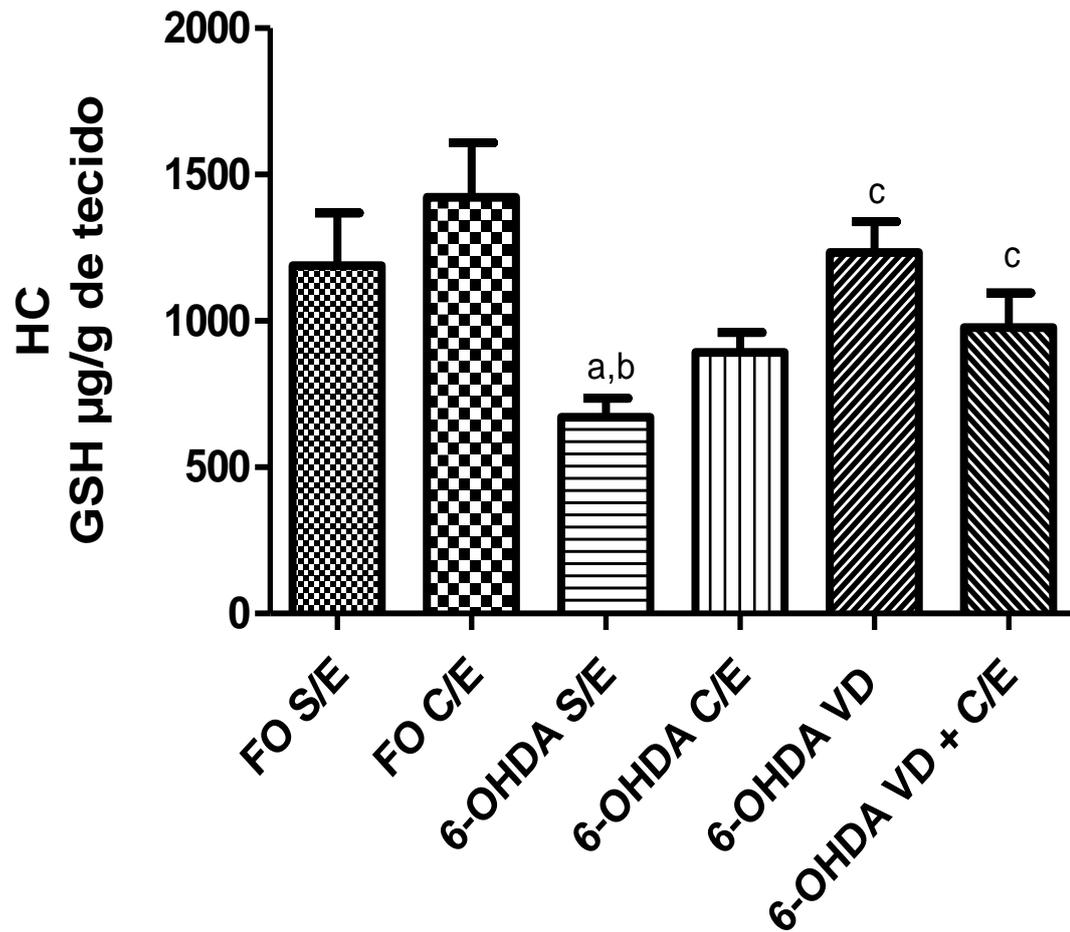
Em relação às concentrações de GSH no HC, no grupo 6-OHDA sem exercício, ocorreu uma diminuíram ( $670,4 \pm 65,49$ ), quando comparado aos grupos, FO sem exercício ( $1189 \pm 180,4$ ) e FO com exercício ( $1423 \pm 186,9$ ). Entretanto, nos grupos, 6-OHDA sem exercício e suplementado com VD ( $1235 \pm 104,1$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $977,2 \pm 119,4$ ) apresentaram um aumento significativo nas concentrações de GSH. Ressalta-se que quando comparado o grupo, 6-OHDA sem exercício e 6-OHDA com exercício ( $892,5 \pm 68,18$ ), não obtivemos um resultado estatisticamente significativo (Figura 49).

**Figura 48** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre as concentrações de GSH em córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



As barras representam os níveis de GSH no CPF. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,05$  (One Way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

**Figura 49** – Efeito do exercício físico e suplementação com VD sobre as concentrações de GSH em hipocampo (HC) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA



As barras representam os níveis de GSH no HC. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs FO S/Ep<0,05, b. vs FO com exercício (C/E) p<0,05 e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E) p<0,05 (ANOVA, Tukey).

### **5.3 Resultados de Imunohistoquímica em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA**

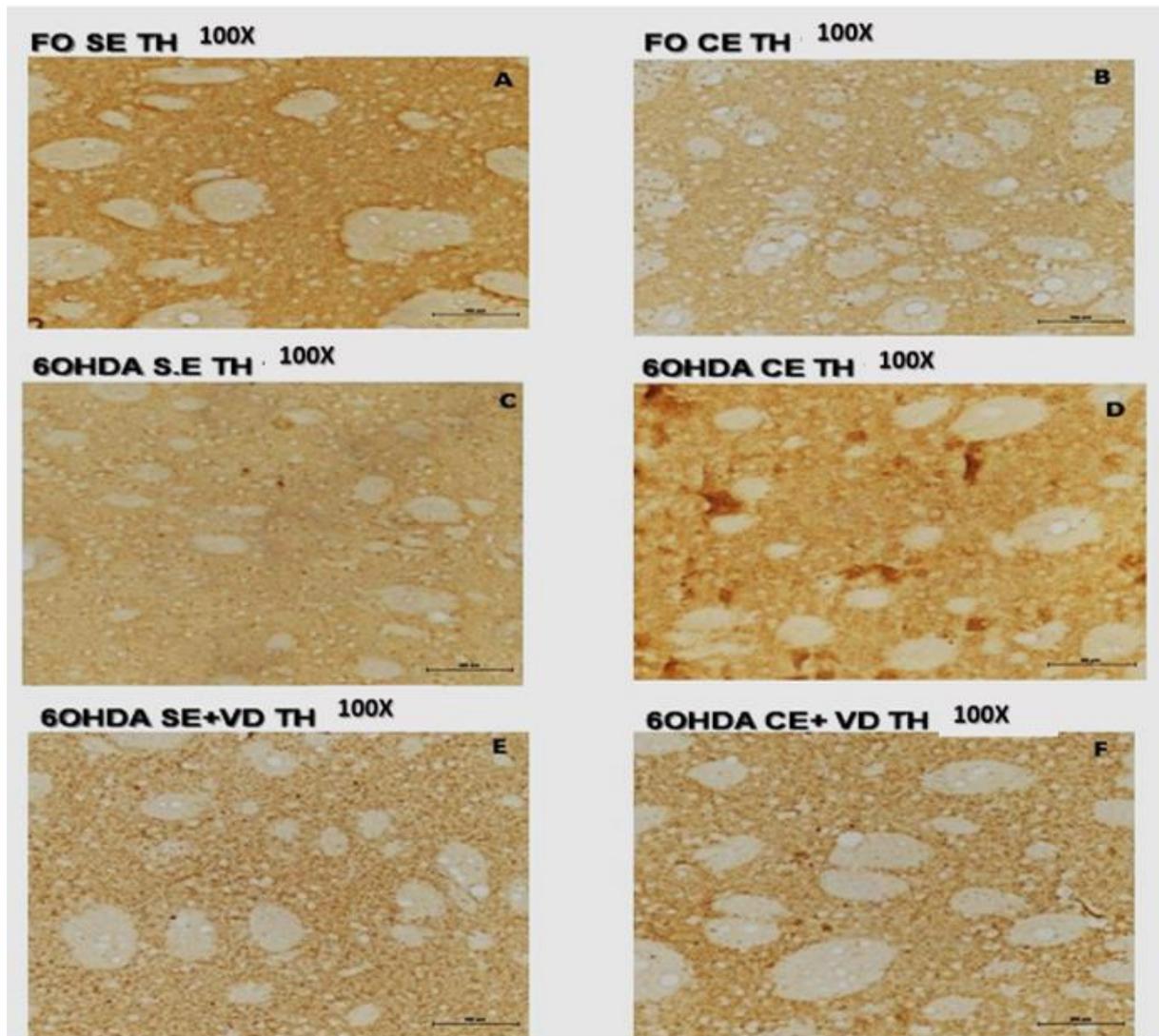
#### **5.3.1 Efeito do exercício físico em esteira e suplementação com VD sobre a imunorreatividade para a tirosina hidroxilase (TH) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA**

Os neurônios dopaminérgicos utilizam a enzima TH, um catalisador inicial do passo da síntese de catecolaminas, que efetua a conversão da tirosina em L-Dopa que, por sua vez, é transformada em DA pela atuação da enzima dopa descarboxilase. A enzima é considerada um biomarcador em modelos de DP. De tal modo, a DP é classificada como uma síndrome estriatal, com carência de TH. Nesta pesquisa, foram identificadas alterações 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 e a suplementação com VD atenuou a perda de TH (Figuras 50).

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

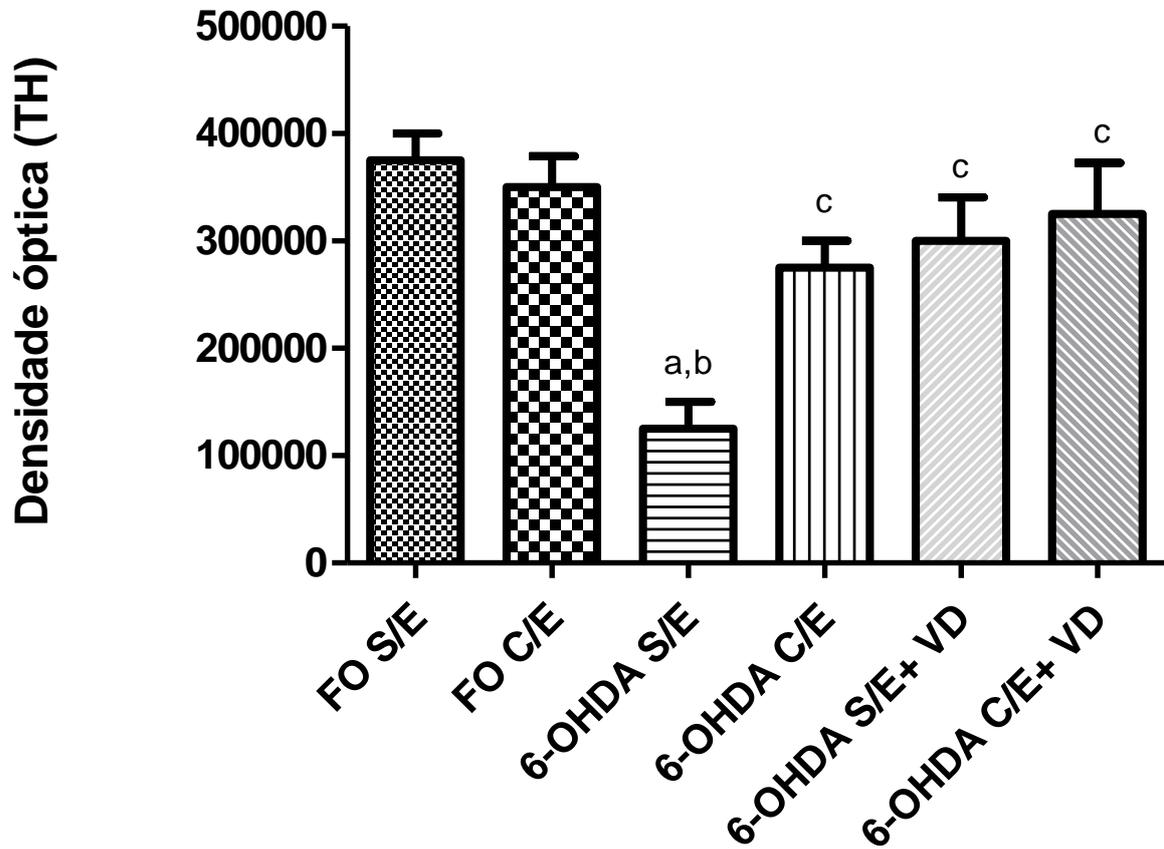
Após o cálculo da porcentagem de DO, os resultados mostraram que o grupo 6-OHDA sem exercício ( $125000 \pm 25000$ ) apresentaram uma redução, quando comparados com os grupos FO sem e com exercício (FO (S/E)  $375000 \pm 25000$ ; FO (C/E)  $350000 \pm 28868$ ), bem como os grupos tratados com exercício e suplementação de VD (6-OHDA (C/E)  $275000 \pm 25000$ ; 6-OHDA (S/E com VD)  $300000 \pm 40825$ ; 6-OHDA (C/E+VD)  $325000 \pm 47871$ ) (Figuras 51).

**Figura 50** – 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 com exercício e suplementação de VD



Fotomicrografia representativa de neurônios imunorreativos para TH no CED de ratos submetidos à lesão estriatal e protocolo de exercício e suplementação de VD de 21 dias. A coloração marron representa células imunorreativas a TH ao longo do CE. A- FO sem exercício, B - FO com exercício, C - 6-OHDA sem exercício, D - 6-OHDA com exercício, E - 6-OHDA sem exercício com VD e F- 6-OHDA com exercício e suplementação de VD. Aumento de 100 vezes. Escala 50µm.

**Figura 51** – 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 e suplementação com VD



As barras representam a análise semiquantitativa da densidade ótica no CED imunomarcado para TH. Foram utilizados 4 animais por grupo. Os valores estão representados como média ± EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ , b. vs FO com exercício (C/E)  $p < 0,001$  e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ . (ANOVA, Tukey).

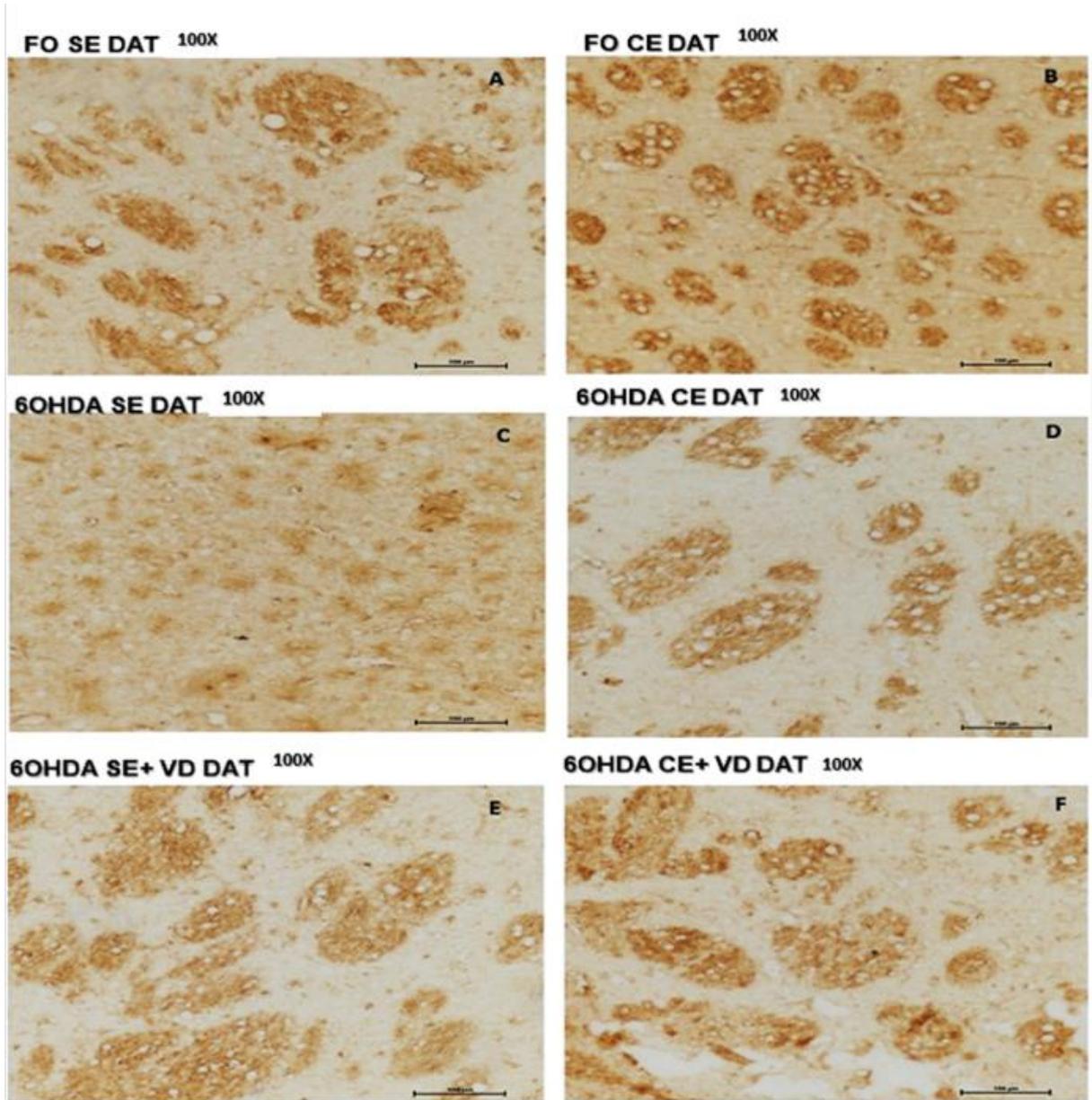
### 5.3.2 Efeito do exercício esteira e suplementação com VD sobre a atividade do transportador de dopamina (DAT) no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA

A dopamina obtém sua liberação na fenda sináptica por exocitose ou por ação reversa de seu transportador dopaminérgico (DAT – *dopamine transporter*). Portanto, o DAT modula a concentração sináptica de dopamina nos terminais pré-sinápticos dos neurônios dopaminérgicos por meio 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. Deste modo, destaca-se que 30% são metabolizados pela enzima citoplasmática catecol-O-metiltransferase (COMT) (PURVES *et al.*, 2004; SAPER, 2000). Assim, na patologia de DP, há arrefecimento na densidade de DAT no neostriado ocasionado pela perda dos terminais dopaminérgicos (STORCH *et al.*, 2006).

Destaca-se a realização da análise semiquantitativa de densidade óptica (DO) das imagens digitalizadas dos cortes histológicos imunomarcados para DAT através do *software imageJ* (*National Institutes of Health, USA*).

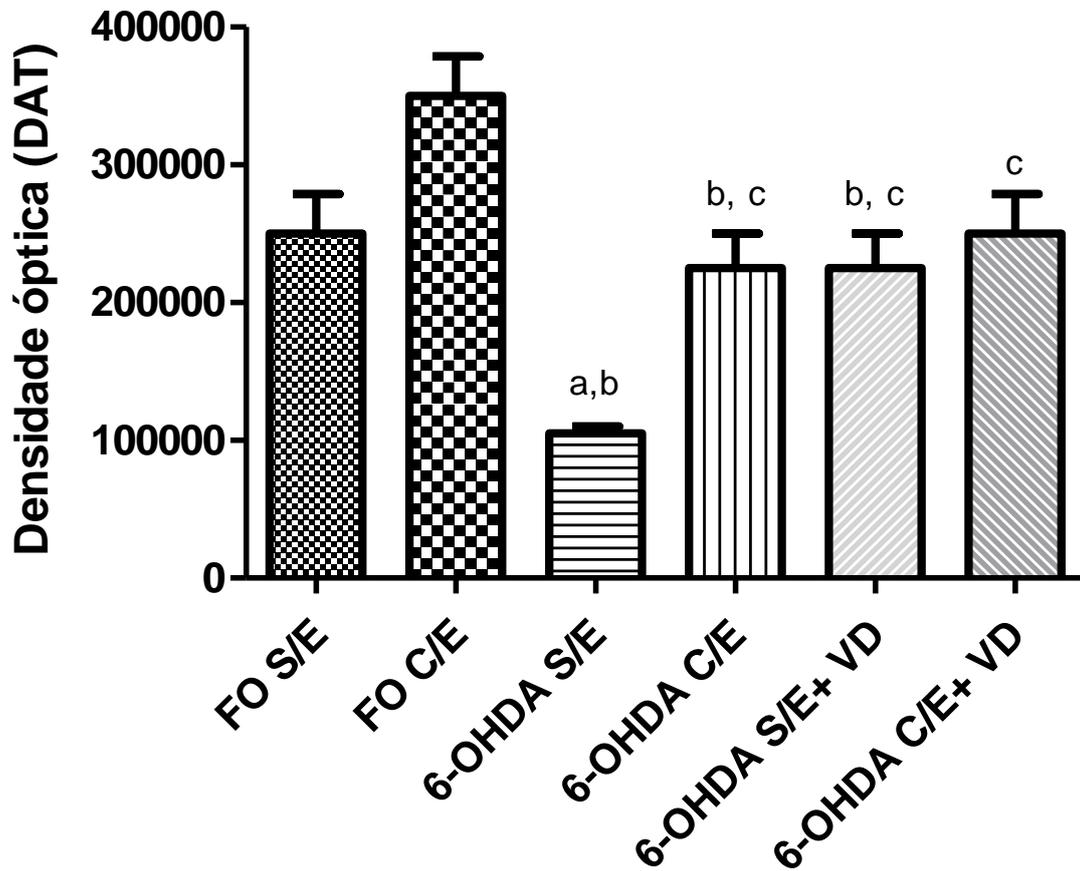
Após o cálculo da porcentagem de DO, os resultados mostraram que o grupo 6-OHDA sem exercício ( $105000 \pm 5000$ ) apresentaram uma redução, quando comparados com os grupos, FO sem e com exercício (FO (S/E)  $25000 \pm 28868$ ; FO (C/E)  $350000 \pm 28868$ ). Contudo, essas injúrias foram revertidas nos grupos tratados com exercício e suplementação de VD (6-OHDA (C/E)  $225000 \pm 25000$ ; 6-OHDA (S/E com VD)  $225000 \pm 25000$ ; 6-OHDA (C/E+VD)  $250000 \pm 28868$ ). Portanto, o protocolo de exercício e suplementação de VD protegeu a perda de DAT (Figuras 52 e Figuras 53).

**Figura 52** – Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunorreatividade para DAT em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD



Fotomicrografia representativa de neurônios imunorreativos para DAT de ratos submetidos à lesão estriatal e protocolo de exercício e suplementação de VD de 21 dias. Coloração marron representa células imunorreativas a DAT ao longo do CE. A- FO sem exercício, B - FO com exercício, C - 6-OHDA sem exercício, D - 6-OHDA com exercício, E - 6-OHDA com VD e F - 6-OHDA com exercício e VD. Escala 50μm.

**Figura 53** – Quantificação da imunomarcção para dopamina (DAT) no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD



As barras representam a análise semiquantitativa da densidade óptica no CED imunomarcado para DAT. Foram utilizados 4 animais por grupo. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ , b. vs FO com exercício (C/E)  $p < 0,001$  e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ . (ANOVA, Tukey).

### 5.3.3 Efeito do exercício esteira e suplementação com VD sobre células GFAP positivas no corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA

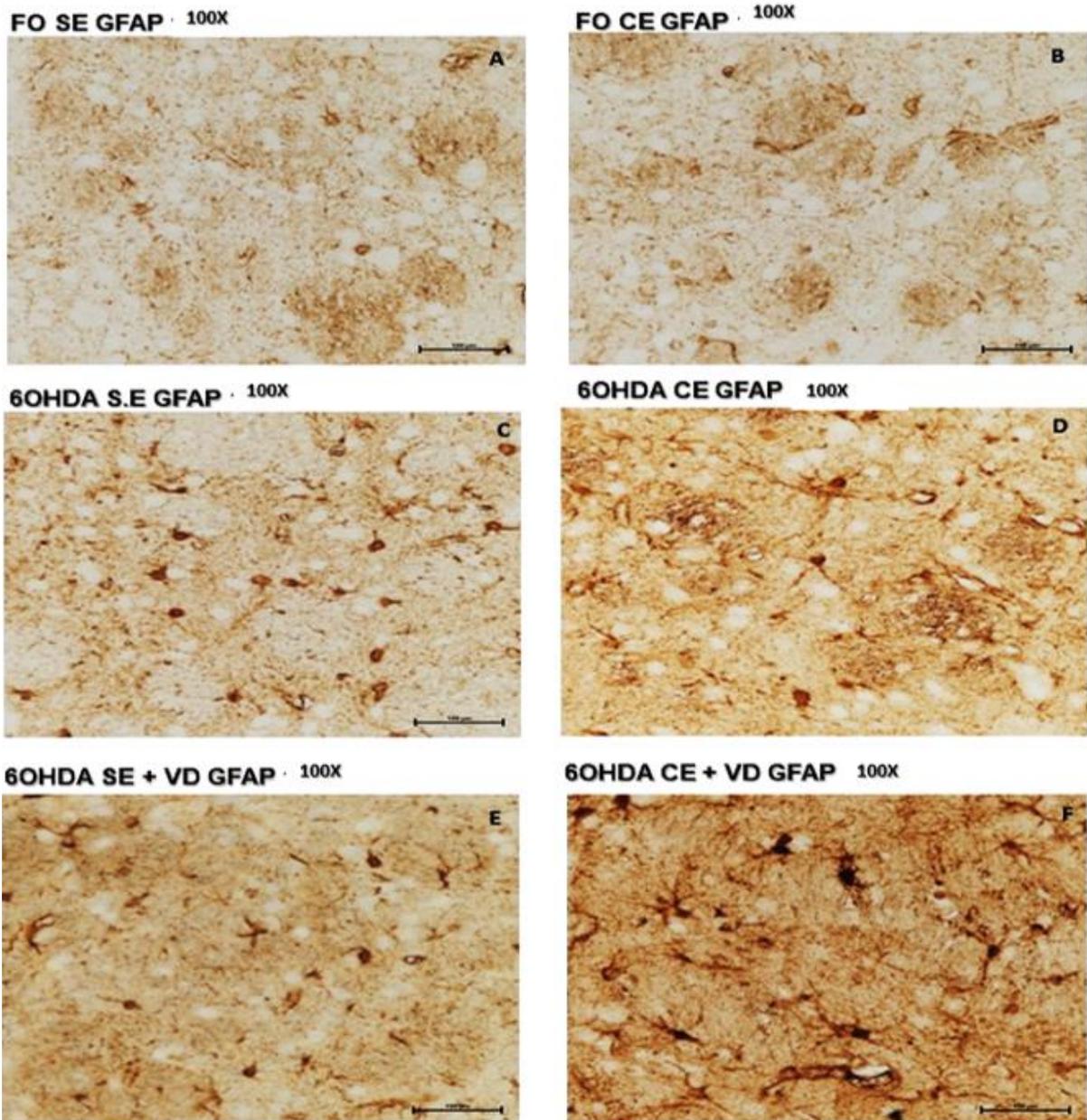
O GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), é evidenciado por numerosos tipos de células do SNC, envolvendo os astrócitos e as células ependimais, sendo empregue para identificar atividade inflamatória no SNC, percebida pela infiltração astrocitária no tecido. Assim, os astrócitos compõem uma formidável população celular dentro do SNC e colaboram para o funcionamento equilibrado. Portanto, os astrócitos exprimem a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), de enorme relevância no comando da configuração e movimento dos astrócitos constituindo-se importante no intercâmbio astrócito-neurônio. Os processos astrocíticos balizados por GFAP têm desempenho essencial na modulação da efetividade sináptica no SNC. Acredita-se que a perda dos neurônios dopaminérgicos na substância negra na DP possivelmente pode estar relacionada as características especiais de astrócitos nessa área (HENNING et al., 2008).

Constata-se que o grupo que obteve exclusivamente a injeção 6-OHDA exibiu uma maior marcação para GFAP (*upregulation*) no corpo estriado do lado lesionado (ipsilateral) em relação ao grupo FO do mesmo lado, enquanto os grupos lesionados e tratados com exercício e suplementação de VD apresentaram menos marcação para GFAP em relação ao grupo 6-OHDA (Figura 54).

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

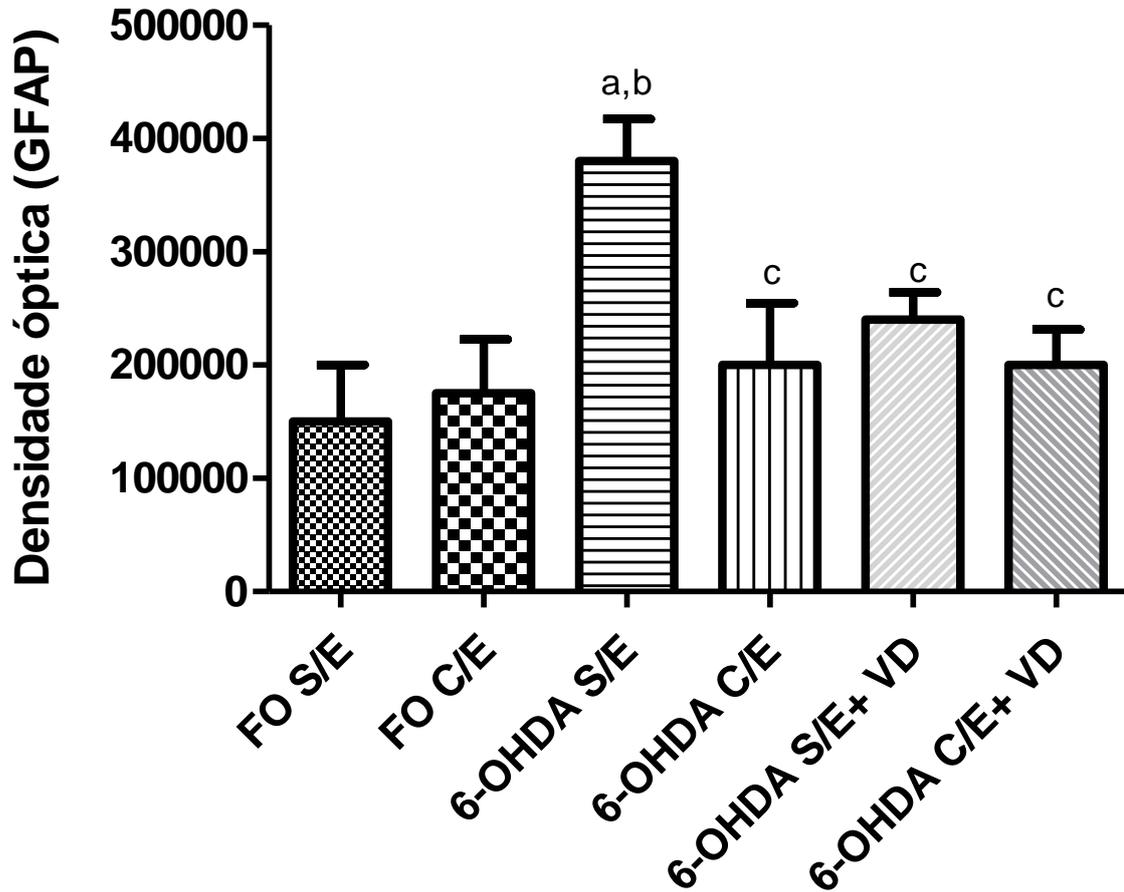
Após o cálculo da porcentagem de DO, os resultados mostraram que, enquanto os grupos FO (FO (S/E)  $15000 \pm 50000$ ; FO (C/E)  $17500 \pm 47871$ ) quase não apresentaram alterações, o grupo 6-OHDA sem exercício ( $380000 \pm 37417$ ) apresentou uma maior marcação de GFAP, já os grupos 6-OHDA com exercício ( $200000 \pm 54772$ ), 6-OHDA sem exercício e suplementação de VD ( $240000 \pm 24495$ ) e 6-OHDA com exercício e VD ( $200000 \pm 31623$ ) exibiram uma menor marcação para GFAP (Figuras 55).

**Figura 54** – Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunoreatividade para GFAP em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD



Fotomicrografia representativa de neurônios imunorreativos para GFAP de ratos submetidos à lesão estriatal e protocolo de exercício e suplementação de VD de 21 dias. A- FO sem exercício, B - FO com exercício, C - 6-OHDA sem exercício, D - 6-OHDA com exercício, E - 6-OHDA com VD e F - 6-OHDA com exercício e VD. Escala 100µm.

**Figura 55** – Quantificação da imunomarcção para GFAP no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD



As barras representam a análise semiquantitativa da densidade ótica no CED imunomarcado para GFAP. Foram utilizados 4 animais por grupo. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ , b. vs FO com exercício (C/E)  $p < 0,001$  e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ . (ANOVA, Tukey).

### 5.3.4 Efeito do exercício esteira e suplementação com VD sobre células GDNF

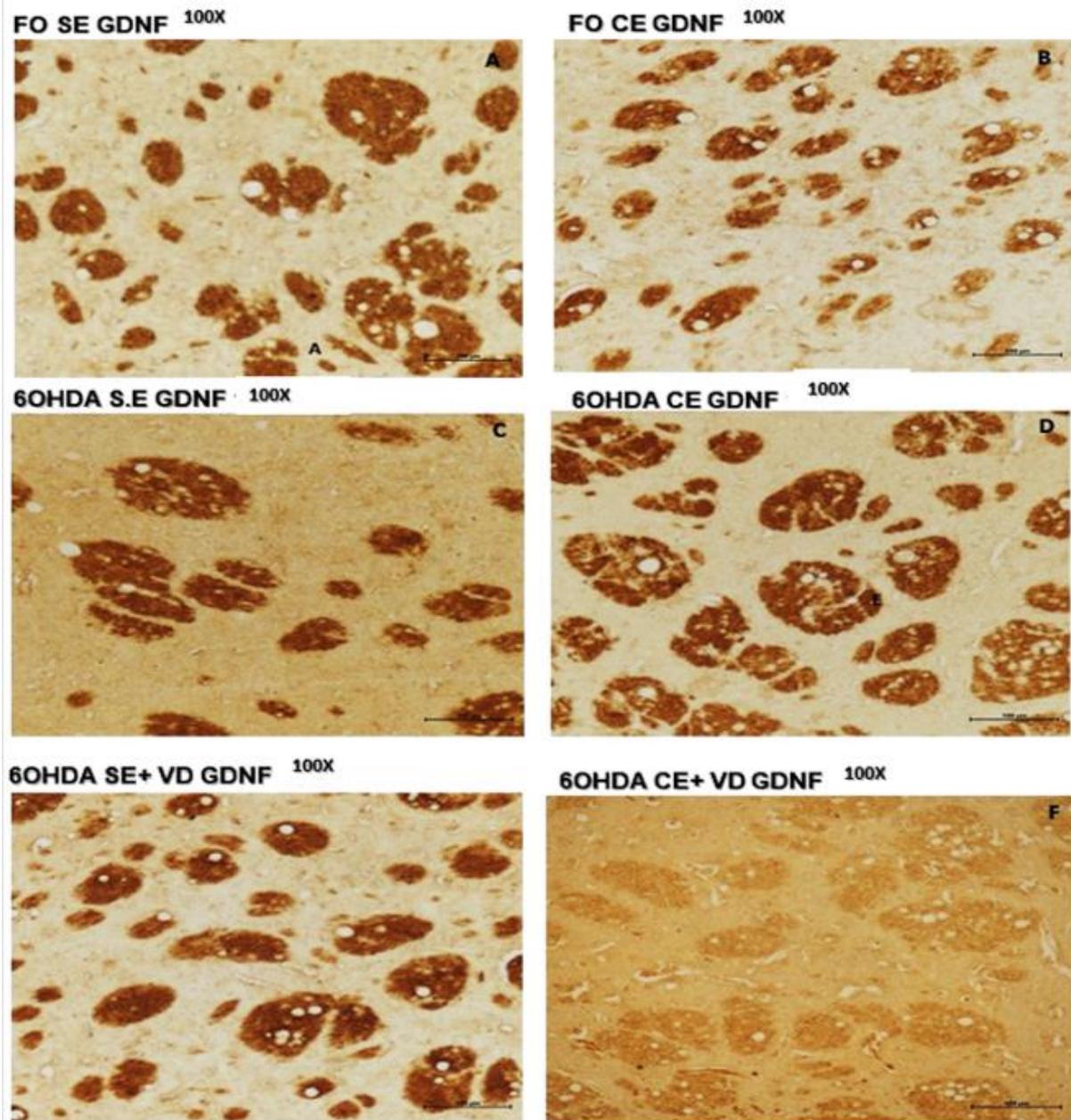
Sabe-se que o fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF) é um robusto neurotrófico dos neurônios DA da via nigroestriatal. Os acréscimos na expressão de GDNF em células de estriado resguardam os neurônios DA contra a lesão da via nigroestriatal, induzida por toxinas, e proporcionam a recuperação de neurônios lesados.

O GDNF é expresso em elevados níveis em neurônios do estriado durante o desenvolvimento pós-natal e regula a morte natural dos neurônios DA da SN (BURKE, 2004). Portanto, o GDNF é também expresso na SN (SARABI et al., 2001), contudo os níveis de mRNA de GDNF nesta região são muito mais baixos do que no estriado (CHOI-LUNDBERG, BOHN, 1995; OO et al., 2005). Os astrócitos reativos no sistema nigrostriatal também expressam vários fatores neurotróficos, incluindo o GDNF (BRESJANAC, ANTAUER, 2000; NAKAGAWA, SCHWARTZ, 2004).

Observa-se que o grupo unicamente com a injeção 6-OHDA exibiu uma diminuição na expressão de GDNF no corpo estriado do lado lesionado (ipsilateral) em relação ao grupo FO do mesmo lado, enquanto os grupos lesionados e tratados com exercício e suplementação de VD apresentaram uma maior marcação de GDNF (Figura 56).

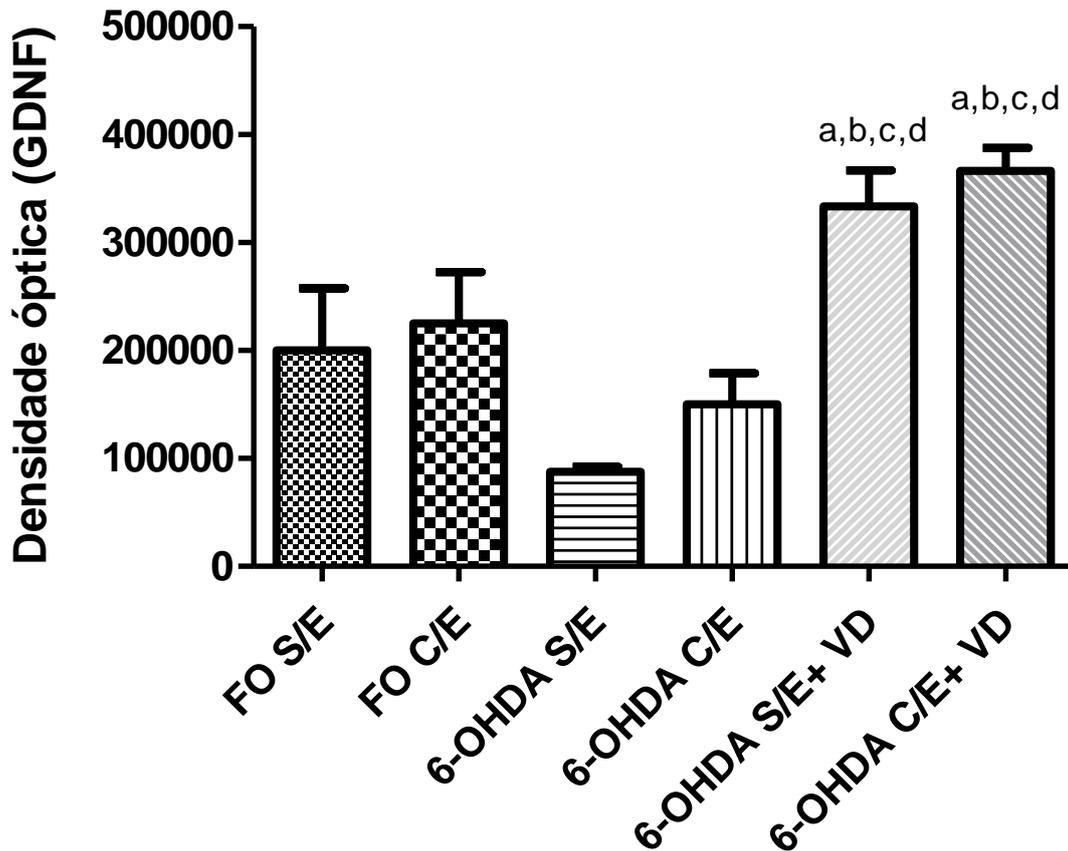
Realizou-se uma análise semiquantitativa de densidade óptica (DO) das imagens digitalizadas dos cortes histológicos imunomarcados para GDNF através do *software imageJ* (National Institutes of Health, USA). Após o cálculo da porcentagem de DO, os resultados mostraram que, enquanto os grupos FO (FO (S/E)  $200000 \pm 57735$ ; FO (C/E)  $225000 \pm 47871$ ) quase não apresentaram alterações, 6-OHDA sem exercício ( $87500 \pm 4787$ ) apresentou uma redução GDNF. Contudo, após a suplementação VD e protocolo de exercício (6-OHDA (S/E com VD)  $333333 \pm 3333$ ; 6-OHDA (C/E+VD)  $366667 \pm 21082$ ), observou-se uma maior marcação de GDNF. Ressalta-se que não obtivemos resultados significativos no 6-OHDA (C/E)  $150000 \pm 28868$ ) Figuras 57).

**Figura 56** – Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunorreatividade para GDNF em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício com suplementação de VD



Fotomicrografia representativa de neurônios imunorreativos para GDNF de ratos submetidos à lesão estriatal e protocolo de exercício e suplementação de VD de 21 dias. A- FO sem exercício, B - FO com exercício, C - 6-OHDA sem exercício, D - 6-OHDA com exercício, E - 6-OHDA com VD e F - 6-OHDA com exercício e VD. Escala 100μm.

**Figura 57** – Quantificação da imunomarcção para GDNF no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD



As barras representam a análise semiquantitativa da densidade ótica no CED imunomarcado para GDNF. Foram utilizados 4 animais por grupo. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ , b. vs FO com exercício (C/E)  $p < 0,001$  e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ . (ANOVA, Tukey).

### 5.3.5 Efeito do exercício esteira e suplementação com VD sobre células Alfa-sinucleína

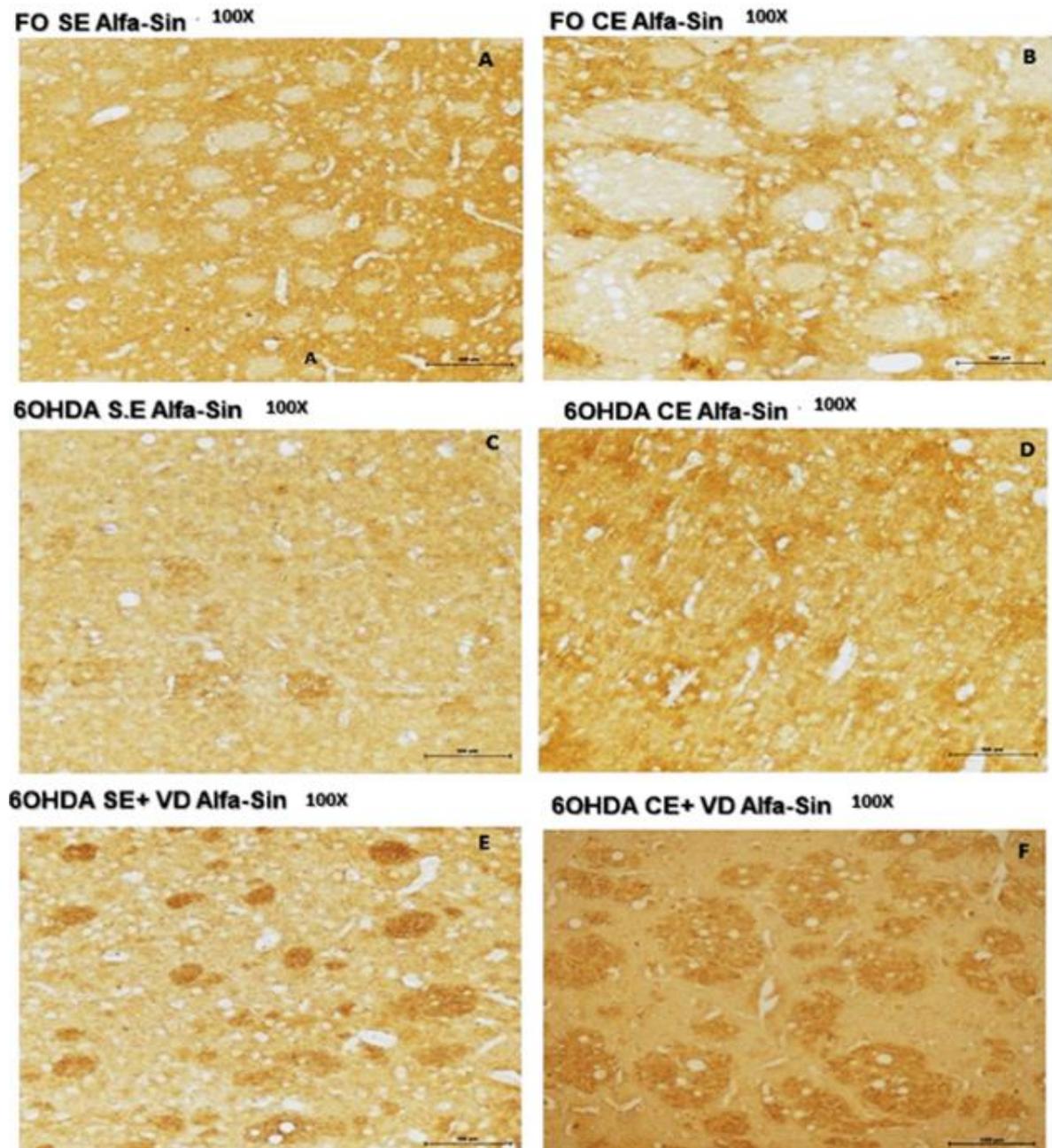
A proteína alfa-sinucleína é importante componente dos corpos de Lewy, marcadores biológicos, e mutações no gene que expressa essa proteína, tendo sua associação a casos de Parkinson hereditário. Alfa-sinucleína é uma proteína presente fundamentalmente nos terminais pré-sinápticos do sistema nervoso central, que está conexa com a DP (RECCHIA *et al.*, 2004).

Postula-se que a Alfa-sinucleína possui uma função fundamental na patogênese da DP, pois pode afetar a homeostase de neurônios dopaminérgicos, elevando os níveis de dopamina no citosol e consequente estresse oxidativo (YSHII LM, 2011).

Observa-se que o grupo unicamente com a injeção 6-OHDA exibiu um aumento na expressão de Alfa-sinucleína no corpo estriado do lado lesionado (ipsilateral) em relação ao grupo FO do mesmo lado, enquanto os grupos lesionados e tratados com exercício e suplementação de VD apresentaram uma menor marcação de Alfa-sinucleína (Figura 58).

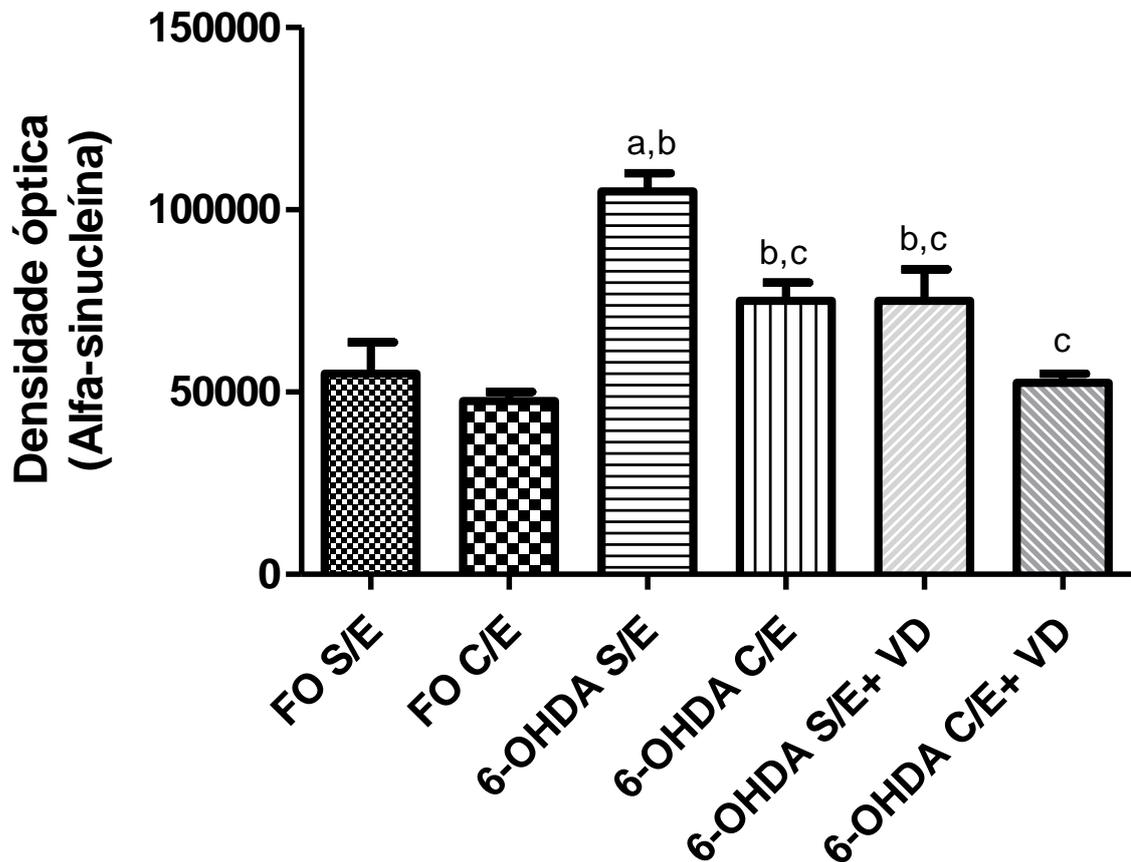
Realizou-se uma análise semiquantitativa de densidade óptica (DO) das imagens digitalizadas dos cortes histológicos imunomarcados para Alfa-sinucleína através do *software imageJ* (National Institutes of Health, USA). Após o cálculo da porcentagem de DO, os resultados mostraram que, enquanto os grupos FO (FO (S/E)  $55000 \pm 8660$ ; FO (C/E)  $47500 \pm 2500$ ) quase não apresentaram alterações, 6-OHDA sem exercício ( $105000 \pm 5000$ ) apresentou um aumento Alfa-sinucleína, contudo após a suplementação VD e protocolo de exercício (6-OHDA (C/E)  $75000 \pm 5000$ ; 6-OHDA (S/E com VD)  $75000 \pm 8660$ ; 6-OHDA (C/E+VD)  $52500 \pm 2500$ ) observou-se uma redução na marcação de Alfa-sinucleína (Figuras 59).

**Figura 58** – Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunorreatividade para Alfa-sinucleína em corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício com suplementação com VD



Fotomicrografia representativa de neurônios imunorreativos para Alfa-sinucleína de ratos submetidos à lesão estriatal e protocolo de exercício e suplementação de VD de 21 dias. A- FO sem exercício, B - FO com exercício, C - 6-OHDA sem exercício, D - 6-OHDA com exercício, E - 6-OHDA com VD e F - 6-OHDA com exercício e VD. Escala 100µm.

**Figura 59** – Quantificação da imunomarcção para Alfa-sinucleína no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD



As barras representam a análise semiquantitativa da densidade ótica no CED imunomarcado para Alfa-sinucleína. Foram utilizados 4 animais por grupo. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a. vs FO sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ , b. vs FO com exercício (C/E)  $p < 0,001$  e c. vs 6-OHDA sem exercício (S/E)  $p < 0,001$ . (ANOVA, Tukey).

### 5.3.6 Efeito do exercício esteira e suplementação com VD sobre células VDR (Receptor de VD)

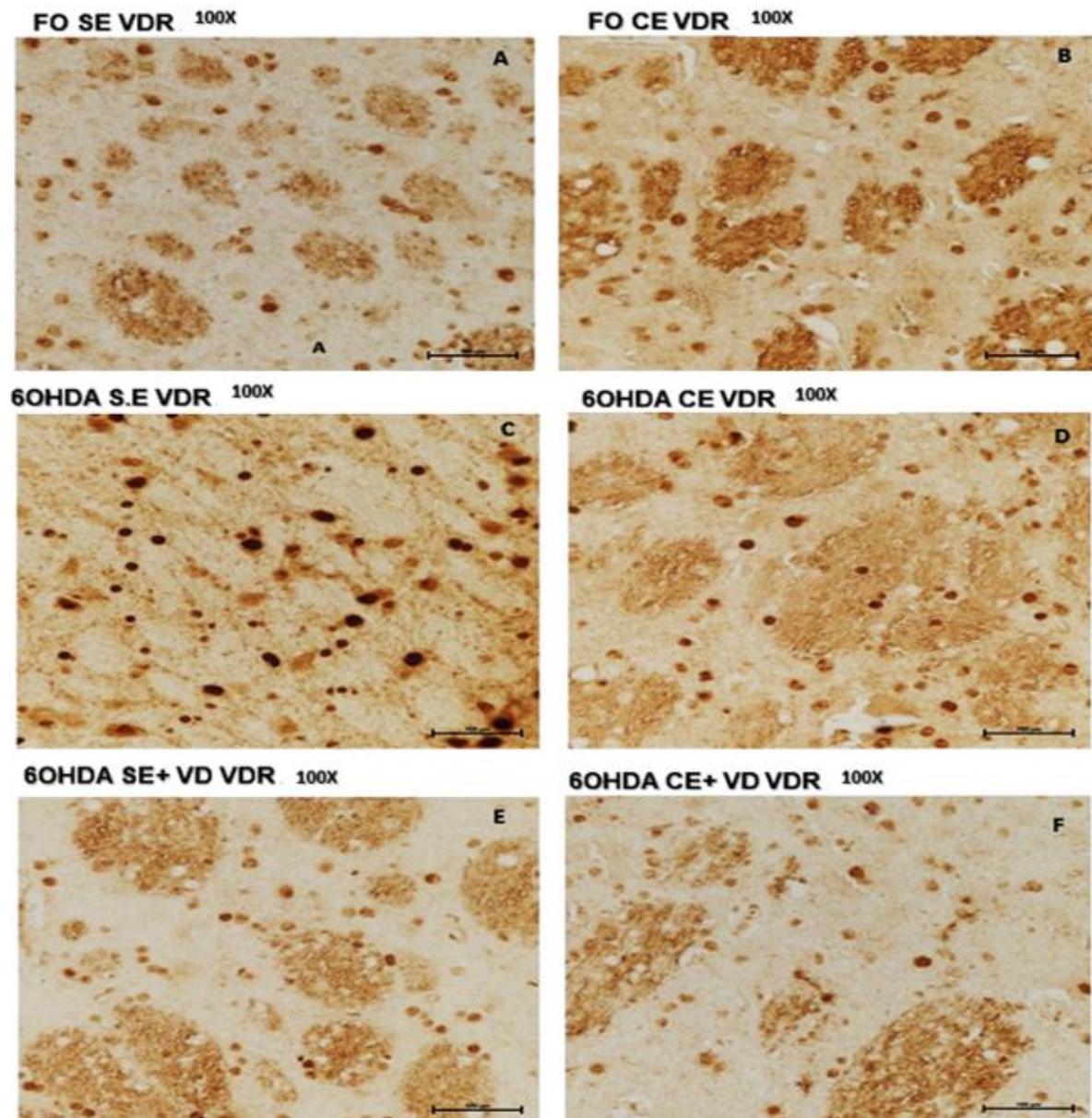
Estudos despontam que a deficiência da VD pode estar relacionada com o desenvolvimento de diferentes doenças como: diabetes, doenças autoimunes, câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (CEKIC *et al.*, 2009; HOLICK, 2007; GARCION *et al.*, 2002). A atividade da VD precisa de sua ligação ao receptor da VD, o VDR, que codifica um fator de transcrição nuclear, e a formação do complexo entre a VD ativa (1,25 OH di-hidroxi-VD) e o seu receptor, e desta maneira afeta a expressão de mais de 1000 genes (MOHRI *et al.*, 2009).

De acordo com os estudos de Gezen-Ak *et al.* (2014), a proteína  $\beta$ -amiloide encontra-se concatenada à degradação da VD, assim como de seu receptor VDR, ocasionando o emprego deficitário da VD, aumentando a susceptibilidade dos neurônios ao envelhecimento e neurodegeneração. Tais achados oportunizam a compreensão de que existe uma relação entre o receptor de VD (VDR) e o desenvolvimento da doença neurodegenerativa (ŁACZMAŃSKI *et al.*, 2015). Assim, a afinidade do VDR com a VD pode ser diminuída pela presença de polimorfismos no gene VDR ou pela deficiência da VD (CAI *et al.* 1993; BOUILLON *et al.*, 1998), que pode afetar mecanismos de detoxificação, homeostase de cálcio e expressão de neurofinas. Isto ocasiona o envelhecimento e dano neuronal, neurodegeneração (GEZEN-AK *et al.*, 2007).

Ressalta-se que o grupo unicamente com a injeção 6-OHDA apresentou uma diminuição na expressão de VDR no corpo estriado do lado lesionado (ipsilateral) em relação ao grupo FO do mesmo lado, enquanto os grupos lesionados e tratados com exercício e suplementação de VD apresentaram uma maior marcação de VDR (Figura 60).

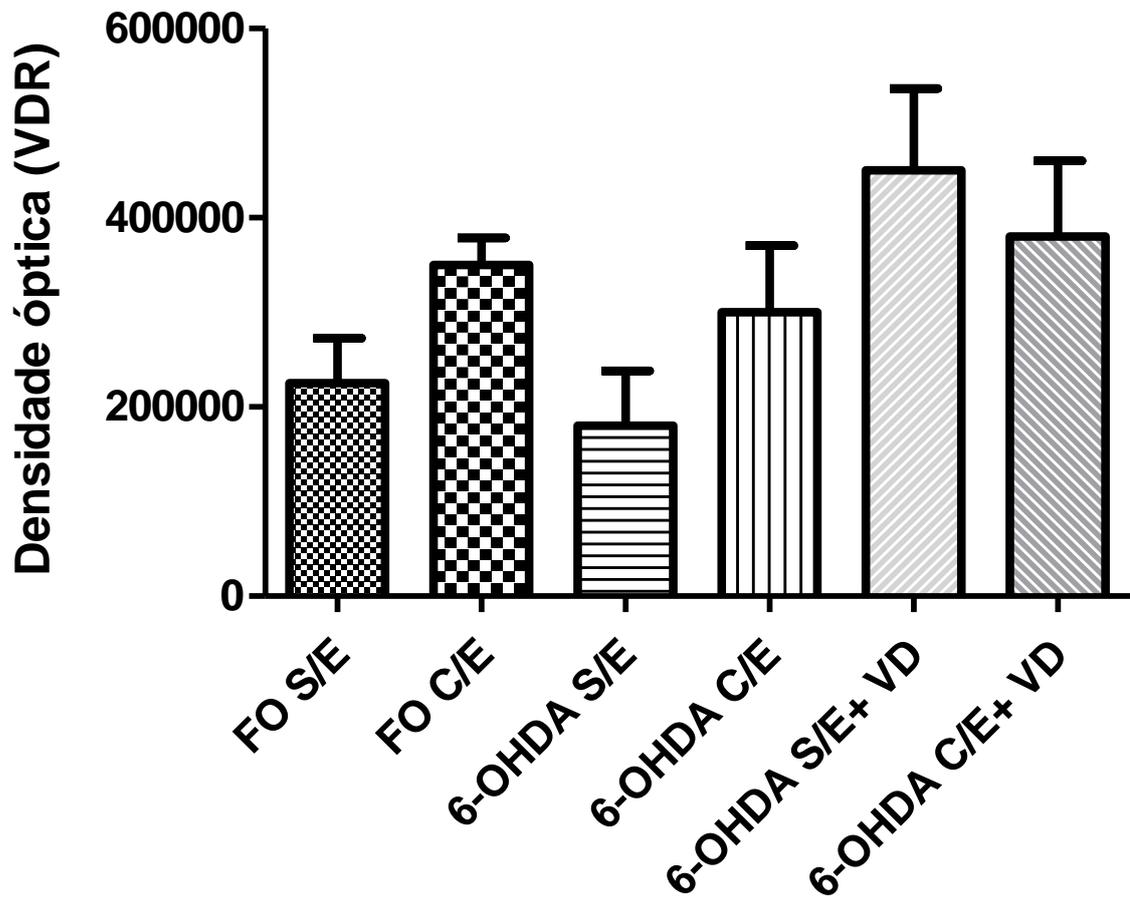
Realizou-se uma análise semiquantitativa de densidade óptica (DO) das imagens digitalizadas dos cortes histológicos imunomarcados para VDR através do *software imageJ* (National Institutes of Health, USA). Após o cálculo da porcentagem de DO, os resultados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (FO (S/E) 225000  $\pm$  47871; FO (C/E) 350000  $\pm$  28868; 6-OHDA sem exercício (180000  $\pm$  58310; 6-OHDA (C/E) 300000  $\pm$  70711; 6-OHDA (S/E com VD) 450000  $\pm$  86603; 6-OHDA (C/E+VD) 380000  $\pm$  8000) (Figuras 61).

**Figura 60** – Fotomicrografias de cortes estriatais marcados pela imunorreatividade para VDR no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício com suplementação de VD



Fotomicrografia representativa de neurônios imunorreativos para VDR de ratos submetidos à lesão estriatal e protocolo de exercício e suplementação de VD por 21 dias. A- FO sem exercício, B - FO com exercício, C - 6-OHDA sem exercício, D - 6-OHDA com exercício, E - 6-OHDA com VD e F - 6-OHDA com exercício e VD. Escala 100µm.

**Figura 61** – Quantificação da imunomarcção para VDR no estriado direito (CED) de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA, submetidos ou não ao protocolo de exercício e suplementação com VD



As barras representam a análise semiquantitativa da densidade ótica no CED imunomarcado para VDR. Foram utilizados 4 animais por grupo. Os valores estão representados como média  $\pm$  EPM, no entanto não foram evidenciadas diferenças estatísticas entre os grupos,  $p > 0,05$  (ANOVA, Tukey).

## 6 DISCUSSÃO

A DP é caracterizada por degeneração seletiva em múltiplas áreas do sistema nervoso central (SNC). Trata-se de uma neuropatologia que possui as seguintes características: degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos, com projeção na substância nigra para o estriado, além da presença de inclusões intracitoplasmáticas manifestas como corpúsculo de Lewy nos neurônios dopaminérgicos sobreviventes (GOBBI *et al.*, 2014; ROSHAN *et al.*, 2016; DICKSON *et al.*, 2017). A diminuição da produção de dopamina, devido uma disfunção da via nigroestriatal e subsequente a perda da dopamina é resultado da degeneração de neurônios da zona compacta da substância nigra.

Embora a patogênese da doença se encontre incerta, fatores e condições ambientais, fator de risco genético, condições do envelhecimento, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e apoptose são importantes contribuintes no transcurso da patologia. Estudos destacam que os níveis plasmáticos de VD, obtidos por meio da dieta ou por meio da exposição solar (WANG *et al.*, 2015), estão adjuntos à patogênese da DP (ZHANG *et al.*, 2014).

Sugere-se, então, que a baixa exposição solar pode inferir nos níveis inferiores de VD (WANG *et al.*, 2015). Endossando esta hipótese, Knekt *et al.*, (2010), demonstrou que pessoas com concentrações de 50 nmol/l de VD apresentavam 65% menos chances de desenvolver a DP, sendo consistentes com resultados descritos de Newmark *et al.*, (2007), mostrando que a deficiência crônica de VD é um indício de risco para o desenvolvimento da doença de DP.

Ressalta-se que o diagnóstico da DP acontece através da avaliação clínica, sendo identificados sinais e sintomas como bradicinesia associada a um destes outros sintomas: tremor de repouso, rigidez ou instabilidade postural (DICKSON *et al.*, 2017; RANA *et al.*, 2015). Destaca-se que os sintomas clínicos da DP só aparecem quando os níveis de dopamina estão reduzidos com valores superiores a 60% do que o normal (FERNANDEZ, 2012). Destaca-se que o tratamento farmacológico para DP é paliativo, atuando exclusivamente sobre os sintomas motores por meio da reposição de dopamina no estriado, que restaura a neurotransmissão perdida com o progresso da neurodegeneração. Assim, o principal

fármaco empregado no tratamento de sintomas motores da DP é um precursor da dopamina, a 3,4-diidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA), sendo a principal alternativa farmacológica para tratamento, melhorando a qualidade de vida dos pacientes nos estágios iniciais da doença (WHITFIELD *et al.*, 2014). Deste modo, as intervenções terapêuticas, principalmente as ações farmacológicas, trazem contribuições expressivas para o tratamento das doenças neurodegenerativas, porém exibem limitações.

Assim, um maior número de estudos fazem-se necessários para o melhor entendimento da patologia, bem como, novas propostas de tratamentos. Diante, do exposto a presente pesquisa buscou avaliar os efeitos do exercício físico associado a suplementação da VD na lesão estriatal unilateral por 6-OHDA em ratos. O fato é que o exercício físico aeróbico e a suplementação da VD, tem demonstrado sua competência, no tratamento da DP por ser capaz de atuar em múltiplos mecanismos patogênicos da doença, como no estresse oxidativo e diminuição da excitotoxicidade.

Para isso, ratos Wistar machos jovens foram submetidos ao exercício físico aeróbico de intensidade moderada e à administração de VD. O exercício foi realizado diariamente por 21 dias, 24 horas após a lesão do corpo estriado direito por injeção de 6-OHDA. Após aplicação do protocolo de exercício e administração de VD, foram realizados testes comportamentais, neuroquímicos e imunohistoquímicos.

Enfatiza-se que diferentes pesquisas utilizam a prescrição do exercício físico voluntário; modelo em que os animais são colocados em ambientes e situações que favoreçam a prática do exercício físico, sem o controle de alguns parâmetros no percurso da execução como, por exemplo, intensidade. Tais pesquisas buscam, portanto, o entendimento dos mecanismos neurobiológicos da neuroproteção (MABANDLA *et al.*, 2004; ZIGMOND *et al.*, 2009; FREDRIKSSON *et al.*, 2011).

No presente estudo, optou-se pelo exercício forçado, moderado e contínuo, utilizando a esteira; equipamento que permite o controle da frequência, intensidade e duração, já que o exercício voluntário, como a roda de correr, não favorece a estruturação destes parâmetros elencados. Elegeu-se a aplicação do exercício físico em esteira, devido sua utilização em estudos com modelos animais de

patologias neurodegenerativas, tendo como destaque as pesquisas de Chen (2003); Chen *et al.*, (2005), Yoon *et al.*, (2007), Lacerda *et al.*, (2009), Hoveida *et al.*, (2011), Rodrigues *et al.*, (2010); Burghardt *et al.*, (2011), Tillerson *et al.*, (2003) *apud* CHO *et al.*, (2013) e Costa *et al.*, (2017).

É sabido que os modelos animais são fundamentais para o entendimento das condições fisiopatológicas, bem como para investigações e avaliação de novas abordagens e propostas terapêuticas (BETARBET *et al.*, 2002; TIEU, 2011; BLANDINI, ARMENTERO, 2012; BOVE, PERIER, 2012; BLESÁ, PRZEDBORSKI, 2014). Outro ponto de destaque para utilização do modelo animal se refere à localização regional e celular do receptor de VD que é notavelmente análogo no cérebro de humanos e de ratos (PRUFER, VEENSTRA *et al.*, 1999; EYLES, SMITH *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que a utilização do modelo animal em ratos para avaliar o efeito da VD é, até então, a ferramenta mais adequada (O'LOAN, EYLES *et al.*, 2007; TURNER, YOUNG *et al.*, 2013), assim como a utilização do protocolo de exercício físico, já que seus efeitos sobre o cérebro estão diretamente adjuntos às características do exercício, incluindo a intensidade, frequência, duração e tipo de treino (AGUIAR *et al.*, 2007; COSTA, 2017).

O modelo da lesão utilizado neste estudo é ocasionado pela toxina 6-OHDA, que induz um dano neural em decorrência do estresse oxidativo. Trata-se de um modelo clássico de DP que provoca degeneração progressiva da via nigroestriatal, associada a alterações comportamentais (IANCU *et al.*, 2005). Tal modelo possibilita diferentes e complexas investigações sobre a DP, devido sua acessibilidade, no que se refere ao baixo custo financeiro e segurança para o pesquisador, quando comparado a outros modelos experimentais empregues como, por exemplo, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina - MPTP, além de boa reprodutibilidade e de promover uma degeneração retrógrada, de caráter progressivo, condição necessária para o desenvolvimento desta pesquisa.

Por se assemelhar à dopamina, a 6-OHDA possui uma alta afinidade para o transportador desse neurotransmissor, transportando a toxina para dentro dos neurônios dopaminérgicos. No neurônio, a substância se acumula no citosol e sofre rápida auto-oxidação, levando a altas taxas de formação de radicais livres

(principalmente o peróxido de hidrogênio). Como um mecanismo adicional, a 6-OHDA pode se acumular na mitocôndria, onde inibe a atividade da cadeia transportadora de elétrons através do bloqueio do complexo I (UNGERSTEDT, 1968; BLANDINI *et al.*, 2008; CIUCCI *et al.*, 2011; PELLEGRINI *et al.*, 2015).

Para Simola e Morelli (2007), esta neurotoxina apresenta um papel basilar na pesquisa pré-clínica de DP. A 6-OHDA é um análogo estrutural de catecolaminas, DA e NA, e exerce os seus efeitos tóxicos sobre neurônios catecolaminérgicos, promovendo a destruição nigroestriatal, apresentando como consequência a diminuição dos níveis de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA), sendo responsável por grande parte dos distúrbios motores presentes na doença (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970; AGUIAR, L., 2009; AHMAD *et al.*, 2012).

A maior parte dos estudos aborda os deficits motores e alterações morfológicas presentes no modelo experimental da DP em análises tardias, aproximadamente duas semanas após a administração de 6-OHDA. É neste momento em que a maior parte dos prejuízos comportamentais motores estão aparentes. Além disso, o deficit dopaminérgico atinge 60 a 80% do conteúdo total no corpo estriado (LEIZ *et al.*, 2011).

Os resultados do presente estudo mostraram que o exercício físico em esteira, pelo período de 21 dias consecutivos, com sessões diárias de 30 minutos em intensidade moderada, e a suplementação de VD melhoraram o desempenho dos animais nos aspectos comportamentais e neuroquímicos. Estudos envolvendo exercício físico por um período de 14 dias consecutivos, durante 30 minutos, já se mostraram efetivos (CHEN *et al.* 2005, COHEN *et al.*, 2003; TILLERSON *et al.*, 2003 *apud* CHO *et al.*, 2013; YOON *et al.*, 2007; COSTA 2016; COSTA *et al.*, 2017). Resultados antecedentes também verificaram os benefícios do treinamento em esteira no modelo animal com a neurotoxina 6-OHDA (REAL *et al.*, 2013; GARCIA; REAL; BRITTO, 2017; REAL; GARCIA; BRITTO, 2017; BINDA *et al.*, 2019).

Destaca-se um aumento no número de evidências que indicam o papel basilar da VD no desenvolvimento do cérebro, na neurotransmissão, na neuroproteção e na imunomodulação (KALUEFF, TUOHIMAA 2007, BUELL, BRIONES, DARWISH 2012; MPANDZOU *et al.*, 2016). Evidências estas que apontam o crescente impacto da deficiência de VD, correlacionada ao acometimento de várias doenças

neurológicas centrais ou periféricas, especialmente neurodegenerativas (KESBY, EYLES *et al.*, 2011, WRZOSEK, LUKASZKIEWICZ *et al.*, 2013). Contudo, os mecanismos moleculares precisos pelos quais a VD desempenha essas ações no cérebro ainda carecem de elucidações (CUI, GOOCH *et al.*, 2017).

Para validação do modelo unilateral por 6-OHDA, realiza-se o teste reconhecido como padrão ouro para análise da atividade rotacional após administração de drogas, tais como anfetaminas, apomorfina e metilfenidato (SCHWARTING; CAREY, 1998). Ressalta-se que após a desnervação da via dopaminérgica, sobre os neurônios estriatais, ocasionado pelas injúrias de 6-OHDA, neste estudo foi evidenciado pela administração da apomorfina. O teste comportamental por apomorfina (agonista dopaminérgico) é categórico para a análise da dimensão da morte de neurônios dopaminérgicos (BETARBET *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2017).

Verificaram-se modificações comportamentais em ratos (21 dias) posteriormente a injeção unilateral de 6-OHDA no CE, acarretando aumento no número de rotações. Resultados similares ao acréscimo no número de rotações no modelo por 6-OHDA e administração de apomorfina foram encontrados nos estudos de Aguiar (2009), Araújo (2018), Costa (2017), Lima (2018), Lucena (2020) e Neves (2014); desenvolvidos no Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Esse teste garante a validação do modelo, bem como o maior entendimento dos achados desta pesquisa.

Constatou-se que nos grupos 6-OHDA com exercício físico, 6-OHDA com VD e 6-OHDA com exercício físico e VD, as anormalidades foram revertidas. Resultados similares foram descritos em pesquisas que investigaram o exercício físico em esteira, posterior à lesão (YOON *et al.*, 2007; TAJIRI *et al.*, 2010; LAU *et al.*, 2011; DUTRA *et al.*, 2012, COSTA *et al.*, 2017).

Com relação à suplementação de VD, o estudo de Lima (2018) demonstrou que o tratamento de 21 dias com VD no modelo de 6-OHDA promoveu considerável atenuação no comportamento rotacional, o que denota um possível efeito neuroprotetor da VD. O que se observa nas pesquisas descritas anteriormente, com relação à aplicação do exercício físico e suplementação da VD, isoladamente, é a efetividade da VD, intensificada pelo exercício, quanto ao efeito neuroprotetor frente

à neurotoxicidade ocasionada pela toxina 6-OHDA. Além disso, a associação do exercício físico com a suplementação da VD, apresenta efetividade na atenuação das alterações comportamentais e neuroquímicas, mostrando que os resultados do presente estudo apontam para uma possível estratégia terapêutica para o tratamento da DP.

Observam-se, na literatura, numerosos testes comportamentais empregados na visualização de deficiências motoras, em modelos animais da DP. Dentre os testes utilizados, destacam-se: campo aberto, rotarod, teste de atividade locomotora e de iniciação motora (JOHNSON; BOBROVSKAYA, 2015; LINS *et al.*, 2017). Para Rizelio *et al.*, (2010) os insultos estriatais por 6-OHDA podem ocasionar modificações na atividade locomotora e coordenação motora dos animais e assim essas avaliações comportamentais fornecem resultados importantes em investigações desse tipo (RIZELIO *et al.*, 2010).

O teste do “rotarod” é uma metodologia utilizada para avaliar a coordenação motora do animal, mediante o tempo de permanência deste em uma barra giratória (DUNHAM, MIYA, 1957; CARMO, 2015). Portanto, é amplamente empregue em roedores para aferir o aprendizado de competências como: coordenação motora, desempenho muscular e equilíbrio. Esses parâmetros são identificadores básicos da atividade motora normal, e uma performance inadequada indica um prejuízo da função, que pode estar relacionado ao estado patológico (BROOKS *et al.*, 2012). Animais com lesão tendem a exibir uma dificuldade de permanência no aparelho, apresentando uma latência menor para a queda, quando comparados aos animais controles sem lesão (DECRESSAC; MATTSSON; BJÖRKLUND, 2012).

No teste *rotarod*, o grupo 6-OHDA sem exercício apresentou uma diminuição de permanência na barra giratória, constatada pelo aumento no número de quedas, sendo estes efeitos revertidos no grupo 6-OHDA com exercício físico, 6-OHDA com VD e 6-OHDA com exercício físico e VD. Os estudos de Goes *et al.* (2014) e Costa (2016) corroboram com os resultados da presente pesquisa, evidenciando que animais lesionados por 6-OHDA tiveram uma redução de permanência da barra giratória, situação revertida com efetividade nos grupos lesionados e submetidos a protocolos de exercício físico.

Sugere-se, então, que esses efeitos advenham do reestabelecimento na coordenação motora e equilíbrio, apontando que realização de exercício físico de caráter rítmico e constante traz indícios de *feedbacks* motores satisfatórios. Demonstrando, assim, uma possível ação neuroprotetora presente nos grupos de tratamento, de forma isolada ou associada, do exercício físico e da suplementação da VD, apresentando importantes implicações para o tratamento da DP.

No teste de campo aberto, observou-se que o grupo 6-OHDA sem tratamento apresentou uma redução significativa da atividade locomotora, bem como na atividade exploratória vertical (*rearing*) e na distância percorrida. No entanto, os grupos 6-OHDA com exercício físico, 6-OHDA com VD e 6-OHDA com exercício físico e VD exibiram uma melhora do desempenho motor, uma vez que houve aumento significativo no número de cruzamento nos quadrantes e *rearing*, além de uma expressiva melhora na distância percorrida. Estes resultados apresentaram similaridade com o estudo de Lima (2017), demonstrando que a lesão por 6-OHDA desencadeou sensível hipolocomoção horizontal e vertical, ao passo que a suplementação com VD reverteu esses agravos.

Sabe-se que o teste do campo aberto é um modelo clássico para avaliação da atividade locomotora, além de ser utilizado para determinar o comportamento do tipo ansioso (ZIMCIKOVA et al., 2017). Desta forma, o campo aberto tem como premissa estudar a ação do sistema dopaminérgico, serotoninérgico e noradrenérgico no comportamento emocional e exploratório por meio da atividade horizontal (locomoção), vertical (*rearing*) e autolimpeza (*grooming*). Constituindo, para avaliação da atuação de substâncias que podem operar sobre esses sistemas de neurotransmissão promovendo modificações motoras (bradicinesia ou hiperlocomoção) e emocionais (ansiedade) (GHIDINI, 2006; ARAÚJO, 2012; ASAKAWA et al., 2016). Em pesquisa de parkinsonismo é largamente empregado para determinar o impacto da intervenção lesiva (AGUIAR, 2009; PREDIGER et al., 2011; CHAO et al., 2012; COSTA, 2016; ARAÚJO et al., 2018; LIMA et al., 2018; LUCENA et al., 2020).

Ainda no que se refere ao teste de campo aberto os presentes achados evidenciam que os animais lesionados com 6-OHDA, submetidos ao protocolo exercício físico e suplementação de VD exibiram uma redução na atividade de autolimpeza avaliadas pelo *grooming* em relação ao grupo lesionado sem

tratamento. O *grooming* é um comportamento inato que se relaciona ao cuidado próprio, presente em diferentes espécies (FENTRESS, 1977; SPRUIJT et al., 1992; KALUEFF et al., 2016), constituindo uma característica relevante no comportamento de roedores. Este processo comumente acontece na direção cefalocaudal e abrange múltiplas regiões, como lambar as patas, lambar os pelos, rabo, movimentos de lavar a cabeça e limpeza da região genital (BERRIDGE; ALDRIDGE, 2002).

Salienta-se que o comportamento de autolimpeza tem como escopo investigar os níveis de ansiedade do animal submetido ao teste. Entretanto, esse pode aumentar quando o animal está tranquilo ou ansioso de modo que apresenta uma curva invertida com relação ao grau de ansiedade, de tal modo, não é interessante a utilização deste parâmetro de forma independente para a determinação do estado de ansiedade, mas torna-se necessário, associação deste com outros achados (LAUREANO, 2010). Assim, ao analisar os estudos experimentais em roedores observa-se que o *grooming* participa na adaptação ao estresse, caracterizando uma forma como estes animais lidam com agentes estressores (KAMETANI, 1988; SCHULZ-KLAUS, 2009).

Ainda com relação à atividade motora, o presente estudo analisou a atividade motora fina, utilizando o teste do cilindro. Este teste é fundamentado no comportamento inato do roedor que explorar o ambiente novo por meio do comportamento de *rearing*, tocando as paredes do cilindro com as patas anteriores (TILLERSON et al., 2001). Logo, os animais com lesão apresentam uma diminuição da utilização da pata anterior contralateral à lesão, exibindo uma assimetria motora (BOIX; PADEL; PAUL, 2015). Evidenciamos, que os animais FO (grupo sem lesão por 6-OHDA), utilizavam ambas as patas simultaneamente para tocar a parede do cilindro, já os animais lesionados com 6-OHDA tocaram o aparato apenas com o membro ipsilateral a lesão. Corroborando com nossos resultados foram observados na pesquisa desenvolvida, por Jouve et al., (2010) e Araújo (2017) no qual estudaram o efeito anti-parkinsoniano da estimulação cerebral no modelo de DP induzido pela 6-OHDA. Nestes estudos os grupos, controle apresentaram uma maior utilização das patas de forma simultânea, enquanto, o grupo com 6-OHDA uma redução na utilização das duas patas simultaneamente.

Os nossos resultados demonstram que o exercício físico e a suplementação de VD, de forma isolada ou em associação, apresentaram uma melhora da função

motora fina, uma vez que, os animais lesionados com 6-OHDA e tratados, tocaram mais vezes à parede do cilindro com a pata contralateral a lesão quando comparado ao lesionado com 6-OHDA sem tratamento. Conseqüentemente, sabe-se que a redução do uso da pata anterior contralateral à lesão, concatena negativamente com o dano neuronal dopaminérgico (DECRESSAC; MATTSSON; BJÖRKLUND, 2012) indicando que tratamentos que apresentam uma redução na assimetria motora no teste do cilindro podem também reduzir a degeneração neuronal. Assim, este parâmetro comportamental pode ser empregado para averiguar o efeito neuroprotetor de novas propostas terapêuticas (GREALISH et al., 2010).

Portanto, a expressão evidente dos déficits comportamentais de ratos submetidos à lesão dopaminérgica por 6-OHDA são vistos geralmente a partir de duas semanas após a lesão (GREALISH et al., 2008; HSIEH et al., 2011) assim, o protocolo de exercício físico realizado após a injúria por 6-OHADA foi capaz de melhorar os déficits comportamentais motores em ratos (BARROSO, 2012; COSTA et al., 2017; O'DELL et al., 2007; TILLERSON et al., 2003; POULTON; MUIR, 2005), semelhantes aos resultados encontrados no presente estudo. Deste modo, o exercício físico é capaz de atenuar os aspectos comportamentais e déficits motores, além de influenciar a curiosidade exploratória em modelo de DP por 6-OHDA. Além disso, estes achados reforçam a neuroplasticidade induzida pelo exercício e suplementação da VD.

Em conjunto, os resultados obtidos foram significativos nos testes do *rotarod*, campo aberto, nos distintos grupos de tratamentos, sugerem, então que o exercício e a suplementação da VD, separadamente ou em associação são capazes de atenuar os prejuízos motores e a neurodegeneração da via nigroestriatal, induzidos pela administração intraestriatal de 6-OHDA, o que predispõem para um indicador de proposta terapêutica. Existem evidências crescentes (MEDHAT et al., 2020) das funções benéficas da prática do exercício e suplementação da VD na manutenção da função cerebral.

Ainda se destaca que além dos sintomas motores clássicos, sinais e sintomas não motores são descritos em pacientes DP, como sinais autonômicos (aumento de salivação, seborreia, constipação, vermelhidão e sudorese), ansiedade, depressão, apatia, hiposmia, distúrbios do sono e declínio cognitivo, acompanhado ou não de demência, estes podem ser explicados pelo comprometimento de outros sistemas

monoaminérgicos como serotoninérgicos e noradrenérgicos (SOUZA et al., 2011; FERESHTEHNEJAD et al., 2019). Os prejuízos não motores na DP são anexos a falhas na regulação de abalizar os sistemas de neurotransmissão (além do sistema dopaminérgico), podendo acontecer muito antes dos sintomas motores, em uma fase inicial da patologia (AARSLAND *et al.*, 2012; BRAAK, FABBRINI *et al.*, 2013; HEIKO et al., 2004; POEWE et al., 2017).

Com relação aos prejuízos cognitivos leves, geralmente aparecem no estágio inicial da DP e avançam progressivamente à demência em condições, avançada da patologia. Com o objetivo de avaliar a função cognitiva dos animais lesionados por injúria de 6-OHADA e tratados com exercício físico e suplementação de VD, analisou-se a memória operacional de curto prazo no teste de alternância espontânea no labirinto em Y (y-maze) (HUGHES, 2004). O teste do labirinto em Y foi utilizado para a avaliação do acometimento da memória operacional ou de trabalho, que se concatena na convergência natural dos animais explorarem ambientes novos, abrangendo o córtex pré-frontal e hipocampo (DELLU et al., 1994).

No teste, foi observado um importante prejuízo na memória operacional, dos animais lesionados com a 6-OHDA, entretanto, demonstrou-se que após 21 dias do protocolo de exercício e suplementação de VD, houve a reversão dos danos cognitivos. A melhora da memória operacional foi observada em grupos submetidos ao protocolo de tratamento. Em consonância com esses dados, trabalhos demonstram que a 6-OHDA, por aumentar o estresse oxidativo, é capaz de desencadear danos na memória operacional similares aos característicos da DP (COSTA, 2016; HEFCO *et al.*, 2003; NASCIMENTO, 2020; PEREZ *et al.*, 2009).

Contudo, o exercício físico e a suplementação da VD foram efetivos em previne significativamente estes prejuízos na memória operacional, promovidos pela 6-OHDA. Ainda em consonância como resultados desta pesquisa, Silva (2020) evidencia que a prática do exercício físico melhorou a memória espacial e a função executiva no teste do Y-maze. Deste modo, o exercício alivia o déficit de memória induzido pelo estresse crônico, e aumento pelo BDNF no hipocampo o que pode ser uma justificativa para a melhora da memória (KIM; LEEM, 2016).

Ainda no que se refere a memória, o teste de reconhecimento de objeto é um paradigma cognitivo que mede a memória de reconhecimento, sendo largamente utilizado para averiguar circunstâncias experimentais em modelos animais nos quais a cognição apresenta-se lesada (HOPKINS; BUCCI 2010). Estudo tem descrito que os déficits cognitivos, tais como redução da memória de reconhecimento, podem anteceder o início da DP (BENITO-LEON *et al.*, 2011; DALAKER *et al.*, 2011).

Verificou-se, nesta pesquisa, alterações na memória de reconhecimento no grupo lesionado por 6-OHDA, quando comparados aos grupos FO. É importante ressaltar que os achados desta pesquisa foram análogos a estudos anteriores, mostrando déficits em tarefas de memória (DE LEONIBUS *et al.*, 2009; FERRO *et al.*, 2005; LUCENA 2019). Entretanto, no grupo 6-OHDA com VD e 6-OHDA com exercício e VD, as implicações dos déficits cognitivos, foram revertidos.

Corroborando com esses achados, estudos, realizados por Góes *et al.*, (2014) e Costa (2016), mostrou que lesões induzidas 6-OHDA ocasionam perda na memória de reconhecimento, estas foram atenuadas com a aplicação do protocolo de exercício. Além disso, diferentes estudos têm demonstram que o exercício físico diminui transtornos cognitivos e comportamentais, assim como anormalidades neurobiológicas em ratos expostos a 6-OHDA (AGUIAR, *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2017; LANDERS *et al.*, 2013; REIJNDERS *et al.*, 2008; TAJIRI *et al.*, 2010).

Diversas pesquisas expõem evidências positivas do exercício físico na plasticidade do sistema nervoso, bem como, no aprendizado e memória (LAMBERT; FERNANDEZ; FRICK, 2005; XIONG *et al.*, 2015). O exercício físico tem um papel de destaque para o controle, prevenção e tratamento da obesidade, câncer, depressão, declínio cognitivo associado ao envelhecimento, distúrbios neurológicos como doença de Parkinson e doença de Alzheimer (DISHMAN *et al.*, 2006).

Muitos estudos apresentam resultados positivos em relação aos efeitos do exercício sobre a memória, associando múltiplos fatores aos processos de proteção e melhora (GIBBONS *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2015). Deste modo, o treinamento físico moderado aprimora o aprendizado e a memória (Radák *et al.*, 2001), a coordenação motora (PETZINGER *et al.*, 2007), como também anormalidades neurobiológicas, (TAJIRI *et al.*, 2010; LANDERS *et al.*, 2013), neuroquímica em ratos expostos à 6-OHDA (TAJIRI *et al.*, 2010; COSTA 2017).

Ainda, estudos demonstraram que o exercício físico melhora a função cognitiva, neuroquímica e mitocondrial em modelos experimentais (ELOKDA et al., 2010; TUON et al., 2010; AGUIAR et al., 2011; LIN et al., 2012; TAJIRI et al., 2010; COSTA et al., 2017), além de ter efeito neuroprotetor (FUNK et al., 2011; COSTA, 2016). Contudo, os mecanismos responsáveis por estes efeitos neuroprotetores são pouco compreendidos e precisam amplamente investigado.

Podemos destacar que pesquisas clínicas apontam uma relação entre os níveis baixos de VD e distúrbios de memória episódica, que se expõem a informações de contexto espacial (SONI, KOS et al., 2012, LITTLE JOHNS, HENLEY et al. 2014). Também tem sido mostrado que a VD está associada a um melhor desempenho cognitivo, onde existe um risco de comprometimento cognitivo (MORRIS et al. 2013, LITTLEJOHNS, HENLEY et al. 2014, TOT BABBERICH EDE, GOURDEAU et al., 2015).

Logo, uma associação entre concentrações reduzidas de VD e prejuízos em funções cognitivas, como função executiva, memória e orientação, é relatada em humanos, bem como, o diagnóstico de demência (LLEWELLYN, LANGA et al., 2009). Portanto, o baixo nível de VD durante a vida adulta também pode estar ligado à deficiência cognitiva e a doenças neurodegenerativas, além de transtornos neuropsiquiátricos (CHENG, XIA et al., 2016, COLLIN, ASSMANN et al., 2016).

Numerosos são os desdobramentos para compreender as condições patológicas da DP, entre estas, estresse oxidativo, inflamação da micróglia, disfunção mitocondrial. É sabido que a principal recorrência bioquímica e molecular da DP é a depleção de DA resultante da destruição da via nigroestriatal. A depleção de 70% das concentrações estriatais de DA antecede o aparecimento dos sintomas clínicos, tal situação acentua-se e a neurodegeneração que acometer diferentes regiões encefálicas (NEVES, 2014).

Assim, a determinação dos níveis deste neurotransmissor e seus metabólitos no corpo estriado oportuniza parâmetro para avaliar a atividade neuroprotetora de fármacos sobre os neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (COSTA, 2016). Portanto, o modelo animal da DP deve imitar tanto a degeneração de células dopaminérgicas, bem como a redução de 60-70% na densidade de fibras TH-

imunorreativas no estriado, acompanhada por uma redução de 50-60% em neurônios TH-imunorreativos na SN (DEUMENS et al., 2002).

De tal modo, o presente estudo evidenciou a partir da quantificação da concentração de monoaminas por HPLC, confirmamos o déficit dopaminérgico no estriado ipsilateral em animais que receberam a injeção unilateral de 6-OHDA, apresentando uma expressiva diminuição nas concentrações de DA e DOPAC, quando comparados aos grupos controles. O DOPAC é metabólito resultante da degradação dopaminérgica, consistir em um derivado da dopamina recentemente sintetizada. Resultados estes, comum aos estudos que reproduzem o modelo 6-OHDA, na qual se caracteriza pela redução da concentração da DA nigro-estriatal somada a redução da concentração de DOPAC, fortalecendo a teoria da degeneração dopaminérgica nesses neurônios pela redução na produção da DA (LEE; SAUER; BJORKLUND, 1996; AGUIAR et al., 2006; CARMO et al., 2014). Resultados similares a redução das concentrações de DA e seus metabólito, foram encontrados nas pesquisas de Aguiar (2009), Araújo (2018), Costa (2017), Lima (2018), Lucena (2020), Neves (2014).

Porém, ressalta-se que nos grupos 6-OHDA com exercício, 6-OHDA com VD e 6-OHDA com exercício e VD, observou-se uma proteção na redução dos níveis estriatais de DA. 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). Desta forma, existem evidências convergentes de estudos clínicos e experimentais de que o exercício pode operar como ação modificadora da DP (AGUIAR et al., 2009; MANTRI et al., 2018; MULLER; MUHLACK, 2010; TOY et al., 2014).

Essas implicações são consistentes com outras pesquisas que descrevem as alterações nas monoaminas em CE lesionado por 6-OHDA, e sua atenuação após aplicação de protocolo de exercício físico em esteira por 28 dias apresentando uma proteção contra a redução dos níveis de DA no estriado em camundongos (PETZINGER et al., (2007). A literatura ainda apresenta, a efetividade da aplicação do protocolo de exercício físico em diferente modelo de DP, como 6-OHDA, MPTP e LPS, com a realização de exercício voluntário e/ou exercício forçado realizado em

esteira mostra que essas manobras são capazes de atenuar a perda de DA nos neurônios dopaminérgicos (REAL et al., 2013; TAJIRI et al., 2010; TUON et al., 2012; WU et al., 2011).

Portanto, o exercício físico aumenta os níveis de DA no estriado (TILLERSON et al., 2003; PETZINGER et al., 2007). Além do exercício também se destaca a restauração da DA, após a suplementação da VD. Nos achados de Lima (2017) evidenciou-se, aumento de DA e seus metabolitos com a suplementação de VD, no pré-suplementação e pós-suplementação em modelo animal, lesionados por 6-OHDA, sendo efetivo na atenuação das injúrias sofridas em ambos os tratamentos. No estudo de Wang et al., (2001), foi demonstrado que pré-suplementação com VD (1µg/kg/dia) foi capaz de suplantiar os níveis de DA, DOPAC e HVA em ratos com lesão por 6-OHDA.

Uma vez que os resultados obtidos nos testes comportamentais e na dosagem da concentração de DA, sugerem que o protocolo de exercício físico e a suplementação com VD proporciona proteção aos neurônios dopaminérgicos no grupo de tratamentos isolados ou em associação do exercício físico e VD, contra os mecanismos de neurodegeneração desencadeados pela 6-OHDA, esses efeitos sugerem uma ação neuroprotetora e seu potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a DP. Em estudos *in vivo*, foi observado que o tratamento com VD atenua a depleção nos níveis de dopamina e serotonina ocasionado pela administração contínua de metanfetamina (KESBY, 2011).

Sabe-se que o cérebro é altamente sensível aos danos causados por radicais livres, por apresentar à sua alta necessidade de oxigênio e à presença de baixas concentrações de enzimas antioxidantes. Assim, há um grande empenho em estabelecer estratégias terapêuticas e alimentares para combater o estresse oxidativo produzido no sistema nervoso central (GAO et al., 2012; VIRMANI et al., 2013).

Associado ao processo de neuroinflamação, o estresse oxidativo é outro fator importante no processo de degeneração neuronal (TAYLOR; MAIN; CRACK, 2013). Contudo, o estresse oxidativo é causado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e NOS), que são moléculas expressivamente reativas, e que podem ocasionar diversos efeitos deletérios no organismo (MOTHERWELL;

ZUO, 2013). Além do aumento destas espécies reativas, o estresse oxidativo caracteriza-se pela depleção dos sistemas antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona reduzida (GSH), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) (FRANCO et al., 2017; NIRANJAN, 2014).

Nesta premissa, diversos estudos identificaram que o estresse oxidativo está presente em diferentes e distintas patologias neurodegenerativas (SULTANA; PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2013; KIM et al., 2015). Embora os mecanismos moleculares da DP ainda não se encontrar completamente compreendidos, múltiplos estudos indicam que as alterações do metabolismo celular, como redução da fosforilação oxidativa mitocondrial (Mandemakers et al., 2007; Mounsey, Teismann, 2011; Pacelli et al., 2011) e a geração de radicais livres (RL) (Baillet et al., 2010; Surendran, Rajasankar, 2010) despontam um relevante papel na patogênese da DP, visto que o cérebro tem um amplo potencial oxidativo, ocasionado pelo elevado consumo de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Neste estudo, a injeção de 6-OHDA produziu dano oxidativo no CE lesionado, confirmado por uma elevação do produto da peroxidação lipídica, o MDA, situação que não ficou restrita a área lesionada, mas exibiu efeitos deletérios na região do CPF e HC. Evidências crescentes sugerem que o estresse oxidativo cumpre um papel importante na fisiopatologia da DP. Já se sabe, que o próprio metabolismo da DA pode cooperar para o estresse oxidativo, assim como a disfunção mitocondrial e a ativação das células gliais (HWANG, 2013; BLESA et al., 2015). Estes danos oxidativos em roedores tratados com 6-OHDA como observado no presente estudo, são consistentes com relatos anteriores (ARAÚJO, 2017; AHMAD *et al.*, 2012; COSTA, 2016; LUCENA, 2019).

Corroborando com nossas evidências, diferentes pesquisas demonstram as decorrências oxidativas sobre várias regiões do cérebro, tais como CPF, cerebelo e HC, sendo este último o primeiro a sofrer os efeitos da 6-OHDA (MATSUMOTO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). Isso confirma que a degeneração progressiva ocasionada pela 6-OHDA pode abranger outras áreas do sistema nervoso central e não exclusivamente aos neurônios da via nigroestriatal. Deste modo, os grupos submetidos ao protocolo de exercício físico e suplementação de VD, apresentaram os efeitos neuroprotetores da VD, uma vez que esta foi capaz de reduzir em uma

condição significativa a peroxidação como mostrado 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.*, 2008, 2010, 2012; POWERS; TALBERT; ADHIHETTY, 2011; TUON *et al.*, 2010; VILLANUEVA; KROSS 2012). Mas, esta resposta pode estar relacionada ao tipo de exercício aplicado. Aguiar *et al.*, (2010, 2011) narraram que o exercício de alta intensidade pode ocasionar o dano oxidativo no cérebro, porém, o exercício de baixa intensidade promove neuroproteção (AGUIAR *et al.*, 2011). Os resultados mostram um efeito preventivo do exercício sobre danos oxidativos cerebrais em lipídios e proteínas, possivelmente devido a um aumento dos níveis das enzimas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

No que se refere a suplementação da VD, no estudo de Lima (2017) em modelo de 6-OHDA promoveu o aumento substancial nas concentrações de MDA no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado ao passo que, tanto o pré-tratamento com o pós-tratamento foram eficazes na redução da peroxidação lipídica nas áreas estudadas. Também foram percebidas redução nas concentrações de MDA por meio da suplementação com VD, nos estudos de Erbasa *et al.*, (2014) e Wiseman (1993).

Portanto, no SNC, a VD está envolvida na regulação da excitotoxicidade neuronal mediada por  $Ca^{2+}$ , na redução do estresse oxidativo e na indução de proteínas estruturais sinápticas como os fatores neurotróficos e neurotransmissores que se encontram deficientes (SANTOS, 2018). Devido à propriedade de regular esses fatores neurotróficos, sugere-se que a VD opere como uma substância neuroprotetora. Esses efeitos neuroprotetores podem ser observados em estudos *in vitro*, nos quais há diminuição da morte celular mediada pelo glutamato em culturas de células neuronais do córtex, hipocampo e mesencéfalo (KESBY, 2011).

No que se refere a produção excessiva de óxido nítrico (NO) na célula está associada ao aumento do estresse oxidativo e à redução da defesa antioxidante, o que torna as células mais vulneráveis. O estresse oxidativo tem sido constantemente associado com o desenvolvimento da DP devido às elevadas condições oxidativas que predomina nos neurônios dopaminérgicos (WHITTON *et al.*, 2007). NO é um

radical livre que dispõem de um elétron isolado e se liga a múltiplos compostos que também contêm elétrons isolados. Difunde-se no citosol e membranas lipídicas, assim como para dentro das células, em concentrações superiores, pode formar espécies tóxicas e reativas, por meio de sua combinação com o  $O_2^{\cdot-}$  ou oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Em situações patológicas, tais como doenças neurodegenerativas, podemos encontrar uma grande concentração de NO capaz de ocasionar 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  $NO_2/NO_3$  (GUO *et al.*, 2007). O estresse oxidativo pode causar efeitos prejudiciais, tais como peroxidação de lipídios de membrana, agressão às proteínas e danos ao DNA (SILVA, COUTINHO, 2010; VALKO *et al.*, 2016).

Neste estudo, foi possível constatar que a infusão da 6-OHDA aumentou os níveis de  $NO_2/NO_3$  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  $NO_2/NO_3$  (ARAÚJO, 2017; GUO *et al.*, 2007; LUCENA, 2019). Uma produção excessiva de óxido nítrico (NO) na célula está associada ao aumento do estresse oxidativo e à redução da defesa antioxidante, o que torna as células mais vulneráveis. O estresse oxidativo tem sido constantemente associado com o desenvolvimento da DP devido às elevadas condições oxidativas que predomina nos neurônios dopaminérgicos (WHITTON *et al.*, 2007).

Adicionalmente, tem sido sugerido que o estresse oxidativo leva à ativação de caspases e consequente apoptose na DP, como também pode levar ou potencializar reações inflamatórias crônicas causando modificações em várias biomoléculas (FRIEDLANDER *et al.*, 2003). A presença de níveis aumentados de ERO promove uma neurodegeneração seletiva na DP. Uma das explicações é a autooxidação da DA (TSANG; CHUNG, 2009).

Ainda, foi mostrado que diversas células da substância negra de pacientes *post-mortem* com DP apresentam um aumento na expressão da enzima, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), em comparação com os pacientes, controle da mesma idade (HUNOT *et al.*, 1996). Está bem constituído que a captura de radicais

livres por antioxidantes é ocasionada pela sua competência de doar hidrogênio (SHINOMOL; MURALIDHARA, 2008).

No organismo o estresse oxidativo é combatido através de antioxidantes endógenos e por sequestradores de radicais livres (STACK et al., 2010). Com isso a administração de agentes antioxidantes tem evidenciado melhorar o estresse oxidativo e atenuação da progressão de doenças neurodegenerativas (ROSENSTOCK et al., 2004) o que os tornam possíveis alvos terapêuticos para diferentes patologias que estejam envolvidas com os radicais livres. Assim, a prática do exercício físico leve ou moderado e a suplementação de VD apresenta-se um importante alvo na terapia da DP, visto que estes agem diretamente na diminuição dos processos oxidativos, por apresentarem característica antioxidante.

Ainda com relação ao aumento do óxido nítrico (NO), os resultados do presente estudo mostraram que os grupos tratados com exercício físico e suplementação da VD, isolado ou em associação apresentaram, uma diminuição nas concentrações de nitrito e nitrato no CPF, HC, CE dos ratos submetidos à lesão pela 6-OHDA. Corroborando com nossos achados, Lima (2017) averigou que a 6-OHDA intensificou a produção de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado e o ao passo que a suplementação com VD foi eficaz em limitar a produção de nitrito/nitrato. Ainda, destaca-se, diferentes pesquisas apontam o potencial que a VD em atenuar a síntese de NO (DURZUN et al. 2013).

Torna-se interessante refletir e entender que algumas pesquisas afirmam que o exercício físico está associado à estimulação da produção de NO (HIGASHI; YOSHIZUMI, 2004; MENEZES, 2012). Entretanto, dependendo da frequência, duração e intensidade, o exercício tanto pode aumentar a produção de ERO e levar a danos oxidativos, como também, em intensidades leves e moderadas, pode melhorar a capacidade de defesa antioxidante do organismo (TUON et al., 2010).

Contudo, nesta pesquisa, o exercício foi capaz de reduzir, expressivamente, estes níveis de EROs nas áreas estudadas e tais achados correlaciona-se ao protocolo de exercício físico adotado no transcurso da pesquisa. Resultados anteriores confirmaram os benefícios do treinamento em esteira no modelo animal com a neurotoxina 6-OHDA (REAL et al., 2013; GARCIA; REAL; BRITTO, 2017; REAL; GARCIA; BRITTO, 2017; BINDA et al., 2019). Tais ações, podem acontecer

ao nível de estriado e o hipocampo, essas são duas estruturas cerebrais que respondem positivamente aos efeitos neuroprotetores do exercício, particularmente sobre a função mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação cerebral (TUON et al., 2010; KE et al., 2011; TUON et al., 2012).

O estresse oxidativo é resultado dos danos a macromoléculas, ocasionando diminuição dos níveis de glutathiona (GSH). Como principal agente redutor na célula, a diminuição dos níveis de GSH é particularmente importante, especialmente porque se encontra significativamente diminuída no início da DP (HASTINGS, 2009). De tal modo, o estresse oxidativo tem sido amplamente discutido como um relevante contribuinte na fisiopatologia das doenças neurodegenerativas (SKOUMALOVA, 2003; SAYRE et al., 2008, CHEN et al., 2009). Destaca-se, que o GSH é a mais importante enzima antioxidante do encéfalo, atuando sozinha ou em conjunto com outras enzimas para remoção dos radicais livres (SMEYNE; SMEYNE et al., 2013). Estudos *post mortem* de indivíduos com DP revelam baixos níveis de GSH no cérebro, em especial na substância negra (SIAN et al., 1994; MAETZLER et al., 2011).

Neste estudo foi observado um decréscimo nos níveis de GSH induzido pela 6-OHDA no CPF e HP. Assim, o protocolo de exercício e a suplementação de VD, alterou positivamente os níveis de GSH. 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, operando em uma configuração que diminuir o estresse oxidativo e, assim, amortizar a incidência de doenças neurodegenerativas (HOLLOSZY, KOHRT, 1995).

Sabe-se que os marcadores neuroquímicos específicos para a DP compreendem a redução de DA, bem como os níveis de TH (HEIKKILA; SONSALLA, 1992). A TH é a uma importante enzima, atuante na síntese de DA em que se caracteriza em uma enzima limitante da velocidade de síntese de DA e estando presente nos neurônios dopaminérgicos na área nigroestriatal (RIBEIRO et al., 2013; GONZALEZ-APARICIO et al., 2010; YANG et al., 2009). Deste modo, o TH é a enzima responsável por catalisar a conversão de L-tirosina para dihidroxifenilalanina, uma precursora da dopamina. De acordo com Furukawa et al., (2004), a carência do TH está pertinente com o desenvolvimento da DP, e isto pode

ser primeiramente identificado por uma distonia do membro unilateral ou assimetria, tremor postural, afetando a coordenação motora e bem como a função cerebral.

Os resultados demonstram que as injúrias sofridas por 6-OHDA, ocasionaram a redução do TH, contudo, este efeito foi revestido nos grupos submetidos ao protocolo de exercício físico e suplementação de VD. Corroborando com nossos resultados, outros estudos que utilizaram o exercício físico como forma de tratamento, embora tanto o volume e intensidade do treinamento daqueles apresentaram condições e características diferentes dos nossos. Assim, Yoon et al., (2007) e Costa et al., (2017) mostraram que a exposição de ratos ao treinamento em esteira durante 30 minutos, uma vez por dia, durante 14 dias consecutivos e após a administração de 6OHDA foi suficiente para aumentar os níveis de TH. Em outro estudo, Tajiri et al., (2010) também usaram o treinamento em esteira e corrida durante 30 minutos, uma vez por dia, durante 4 semanas, o que demonstrou resultados satisfatórios de fibras TH-positivas no estriado e em neurônios da SNpc.

Quanto aos níveis de expressão de TH este estudo demonstrou que os animais que realizam exercício físico, independente do tempo, se a curto ou longo prazo, despontaram aumento na expressão de TH no SNc do que aqueles não expostos ao exercício. Deste modo, a maior expressão de fibras TH-positivas e maior número de células TH-positivas pode ser relacionado ao efeito neuroprotetor correlacionados ao exercício (FERREIRA et al., 2020). Em estudos com modelos de DP, MPTP, LPS e com protocolo de treinos diferenciados, quanto ao tempo e intensidade (9 dias, 14 dias, 4 semanas, 18 semanas) foram identificados que sempre há uma neuroproteção dopaminérgica tanto na SNc quanto no CPU naqueles animais que são submetidos ao exercício físico (LAU et al., 2011; REAL et al., 2013; TILLERSON et al., 2003; YOON et al., 2007).

Um dado relevante apontado em vários estudos, é que o exercício físico é capaz de promover aumento nos níveis de expressão de BDNF (REAL et al., 2013; TUON et al., 2012; WU et al., 2011) e a neuroplasticidade induzida pelo exercício pode ocorrer através do crescente aumento da atividade enzimática de TH que modula a síntese de dopamina pelos neurônios dopaminérgicos (DA SILVA et al., 2016). Essas evidências são consistentes com pesquisa anterior de nosso grupo de pesquisa que demonstrou um aumento de BDNF em grupos lesionados por 6-OHDA e submetidos ao protocolo de exercício físico, apresentando também uma melhor

expressão de TH, é que essa expressão de também foi significativa em animais não lesionados (COSTA, 2016).

Observando as alterações nos níveis de TH, algumas pesquisas realizaram protocolos que mostram os efeitos benéficos do exercício físico quando este é realizado não unicamente após a indução da modelo de DP, mas antes da realização da indução, mostrando uma possível forma de prevenção da DP (REAL et al., 2013; ZIGMOND et al., 1990). Petzinger et al., (2007) demonstraram que o exercício físico em esteira por 28 dias protegeu contra as injúrias por 6-OHDA, além disso, os autores relataram que o exercício físico reduz o imunodeteção de DAT e de TH no corpo estriado.

Com relação ao estudo de Lima (2017) os resultados da administração da VD foram contundentes tanto no pré-tratamento quanto no pós-tratamento demonstrando a eficácia da VD na manutenção da citoarquitetura estriatal e sendo ratificada pelos testes imunohistoquímicos para TH e DAT onde novamente a suplementação com VD se mostrou efetiva na neuroproteção contra a 6-OHDA. Para Sanchez et al., (2009) a administração da VD restaura os níveis de TH no estriado e na substância negra de ratos submetidos a lesão nigroestriatal por 6-OHDA. Outros mecanismos de ação da neuroproteção mediada pela VD são, inibição do estresse oxidativo, da ativação microglial e na neurotoxicidade mediada pelo glutamato (CASS et al., 2014; CASS et al., 2012; KIM et al., 2006; NAVEILHAN et al., 1996; ORME et al., 2013; SMITH et al., 2006).

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. Neste sentido, múltiplos mecanismos têm mostrados para regular a atividade e os níveis de DAT, onde podemos destacar: a expressão gênica da proteína e do número de transportador; ativação da fosforilação através de receptores para glutamato, por exemplo, o receptor metabotrópico mGluR5; e internalização em endossomas moderada pela DA (PAGE et al., 2001).

Na presente pesquisa, foi demonstrado que a neurotoxina 6-OHDA promoveu uma diminuição na imunorreatividade para o DAT, no corpo estriado. Em estudos anteriores do nosso grupo, demonstramos esta alteração na expressão DAT modelo animal por 6-OHDA (ARAÚJO, 2017; COSTA et al., 2017; LIMA et al., 2018;

LUCENA, 2019). Nossos resultados apresentam similaridade com outros estudos que apresentam redução da expressão e na imunorreatividade do DAT no corpo estriado em animais que sofreram injúrias nigroestriatal com 6-OHDA ou com o MPTP (YOKOYAMA *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2009; AFONSO-ORAMAS *et al.*, 2010).

Desta forma, as modificações na atividade e níveis de DAT na membrana dos neurônios podem intervir nos níveis de DA na fenda sináptica. No estriado, o transportador de dopamina (DAT) é uma condição vital para conservação do nível suficiente de DA, com responsabilidade pela recaptação da DA pela membrana pré-sináptica. Igualmente, a redução do DAT estriatal na DP é reputada como o principal fator do prejuízo motor (CHOTIBUT *et al.*, 2012). Evidenciamos, no presente estudo, que a aplicação do exercício físico e suplementação da VD de forma isolada ou em associação atenuou o déficit de DAT em ratos com injúrias por 6-OHDA, provavelmente pelo aumento na sobrevivência neuronal, contribuindo na recaptação da DA, cooperando para a conservação dos níveis dopaminérgicos, em consonância com os achados demonstrados por HPLC, e contribuindo para a manutenção do padrão motor do animal.

Ainda para o entendimento, dos agravos da DP, ressalta-se que os astrócitos são importantes por fornecerem suporte nutricional e estrutural para neurônios, por participarem funcionalmente da barreira hemato-encefálica (Bignani, 1991) e por participarem de outras funções propostas tais como detoxificação, fagocitose, funções imunes e outras (MONTGOMERY, 1994). Neste contexto a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é outro relevante filamento intermediário e sintetizada nos astrócitos e células de Schwann (GUO-ROSS *et al.*, 1999). A GFAP exerce papel na modulação da motilidade e forma celular, já que proporciona estabilidade estrutural aos astrócitos (EDDLESTON; MUCKE, 1993). Em processos patológicos, os astrócitos respondem imediatamente, e, por outro lado, alterações celulares em astrócitos são identificadores seguros de lesão do sistema nervoso central (SNC) (LANTOS 1990, MALHOTRA *et al.*, 1990).

Portanto, a identificação histológica de astrócitos normais ou em situação patológica tem sido utilizada por meio de método imunoistoquímico que identifica antígenos da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), componente dos filamentos de tamanho intermediário do citoesqueleto celular, presente nos astrócitos e em determinadas células (ENG, GHIRNIKAR 1994; CULLEN 1997). Assim, o GFAP é o

marcador imunistoquímico mais confiável e amplamente utilizado para identificação de astrócitos (CATALANI et al., 2002; SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Deste modo, os achados desta pesquisa constataram, que o grupo que obteve exclusivamente a injeção 6-OHDA exibiu uma maior marcação para GFAP (*upregulation*) no corpo estriado do lado lesionado (ipsilateral) em relação ao grupo FO do mesmo lado, enquanto os grupos lesionados e tratados com exercício e suplementação de VD apresentam menos marcação para GFAP em relação ao grupo 6-OHDA.

Contudo, destaca-se que as funções dos astrócitos reativos ainda não são bem compreendidas e tanto efeitos benéficos como prejudiciais são atribuídos a esse processo (SOFRONIEW, 2005). Entretanto, o aumento na expressão de GFAP também pode ser reflexo de uma ampliação substancial no metabolismo astrogliar e na síntese de proteínas, sólido com uma hipertrofia celular saudável em resposta ao aumento de exigências fisiológicas (EDDLESTON; MUCKE, 1993). O fato é que os grupos tratados apresentaram uma redução significativa na imunimarcação para GFAP, oportunizando a compreensão para um possível potencial terapêutico dos tratamentos em questão.

Precisamos compreender que os fatores neurotróficos são proteínas secretadas por neurônios e células da glia que regulam o desenvolvimento, manutenção, função e plasticidade do sistema nervoso, dentre os quais se destacam o BDNF, o fator neurotrófico da dopamina cerebral (CDNF) e do fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos (MANF) e o fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF). O GDNF possui um papel neuroprotetor, ativando interações complexas entre várias cascatas de sinalização responsáveis pela diferenciação e proliferação celular, bem como a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos no cérebro adulto (PASCUAL et al., 2011).

O GDNF é expresso em níveis elevados em neurônios do estriado durante o desenvolvimento pós-natal e regula a morte natural dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (AKERUD et al., 1999). Estas descobertas, o GDNF surgiu como um potencial agente terapêutico para doenças neurodegenerativas, incluindo a DP (D'ANGLEMONT DE TASSIGNY; PASCUAL; LOPEZ-BARNEO, 2015), por regular a diferenciação neuronal, a manutenção do fenótipo e atividade sináptica, proteger os

neurônios adultos de lesões mecânicas, tóxicas ou isquêmicas, e reduzir a morte de neurônios por necrose, que está presente em neurônios dopaminérgicos em desenvolvimento e em neurônios maduros (AIRAKSINEN; TITIEVSKY; SAARMA, 1999).

O GDNF promove a sobrevivência e diferenciação de muitos outros tipos de populações neuronais, tais como neurônios motores da medula espinal e encefálicos, neurônios noradrenérgicos do tronco encefálico, neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, neurônios entéricos, células de Purkinje do cerebelo e neurônios simpáticos e sensoriais (SANDHU et al., 2009). Evidenciamos em nossos resultados, que o grupo tratado unicamente com a injeção 6-OHDA exibiu uma diminuição na expressão de GDNF no corpo estriado do lado lesionado (ipsilateral) em relação ao grupo FO do mesmo lado, enquanto os grupos lesionados e tratados com exercício e suplementação de VD apresentaram uma maior marcação de GDNF. Corroborando com nossos achados, Aguiar (2018) destaca que o exercício físico aumentou os níveis estriatais de GDNF, que exercício físico em esteira proporcionou um aumento nos níveis de GDNF no estriado de animais discinéticos fornecem uma nova visão mecanicista.

Cohen et al., (2003) demonstraram que o exercício forçado pré-lesão pode prevenir os déficits comportamentais e neuroquímicos induzidos pela administração de 6-OHDA, e correlacionaram esta proteção ao exercício físico, que ocasionou o aumento dos níveis estriatais de GDNF. Por sua ação sobre o sistema motor, o GDNF tem sido estudado em modelos experimentais de patologias neurodegenerativas, como a DP (MIYAZAKI et al., 2001). Ressalta-se que além dessas afecções predominantemente motoras, o GDNF está correlacionado à demência e deficiência cognitiva (WINKLER et al., 1996; AIRAKSINEN et al., 1999; ROSENBLAD et al., 2003).

Tajiri et al., (2010) mostraram que o exercício exerce ações neuroprotetoras no sistema dopaminérgico e acresce a migração neuronal, pelo menos em parte, por meio da modulação do microambiente, incluindo a regulação de BDNF e o fator neurotrófico proveniente de células gliais (GDNF), aumento da neurogênese e diferenciação celular. Assim, a atuação neuroprotetora do GDNF no sistema nigrostriatal pode resultar não apenas de um efeito direto sobre os neurônios DA, mas também através de um impacto indireto sobre estes, pelo meio da modulação

de interações gliais e da cascata neuroinflamatória que acometem a DP (ROCHA et al., 2012). Dados de Yoon et al., (2007) demonstram que ratos submetidos ao exercício físico em esteira por 14 dias contínuos após lesão da SNpc pela 6-OHDA proporcionaram níveis mais superiores de fatores neurotróficos como o BDNF e GDNF. Tajiri e colaboradores (2010) expuseram o efeito do exercício forçado em esteira por quatro semanas após lesão por 6-OHDA sobre os níveis de GDNF no corpo estriado de ratos.

Assim, ressalta-se que uma das configurações pelos quais o exercício físico é capaz de proteger os neurônios dopaminérgicos contra o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e outros processos inflamatórios e apoptóticos é através da regulação de fatores neurotróficos. Vários estudos descrevem a capacidade do exercício físico em aumentar os níveis de fator neurotrófico proveniente do encéfalo (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) (AL-JARRAH et al., 2010; LAU et al., 2011; REAL et al., 2013; TAJIRI et al., 2010).

Connor e Dragunow (1998) hipotetizaram que a DP resultaria da carência de fatores neurotróficos agindo sobre neurônios dopaminérgicos. Pesquisa realizadas *in vivo* e *in vitro* apontaram que o GDNF é capaz de desempenhar ações neuroprotetoras salutar sobre neurônios dopaminérgicos de roedores (BJORKLUND et al., 1997; Aoi et al., 2000), impelido a morte destes neurônios induzida por agentes neurotóxicos (CASS; MANNING, 1999; KIRIK et al., 2000; CASS et al., 2002). Kearns et al., (1997) destacaram que o GDNF apresentou efeitos positivos na função dopaminérgica de ratos jovens submetidos à lesão unilateral por injeção da neurotoxina catecolaminérgica 6-OHDA, confirmando papel importante do GDNF na neuroproteção contra esta droga.

Contudo, Kesby (2011), descreve que a diminuição do conteúdo dopaminérgico nos tecidos pode relacionar, ao tratamento prévio com VD, levando também a um aumento de GDNF (SANCHEZ, 2009; SMITH, 2006). Estudos também indicam que o desenvolvimento de neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral pode ser dependente dos níveis de GDNF, o que por conseguinte poderia afetar a liberação de dopamina no núcleo accumbens. Levanta-se a ponderações de que a redução de GDNF, foi observada em animais deficientes em VD (KESBY, 2011).

Nesta premissa, a VD regula a sinalização neurotrófica através da regulação do fator de crescimento derivado de células gliais (GDNF) e do fator de crescimento neural (NGF), sendo importante para a sobrevivência e migração de neurônios em desenvolvimento no cérebro (KESBY, 2011). O GDNF é um importante modulador do desenvolvimento, sobrevivência e função de neurônios dopaminérgicos. Pesquisas de Liu et al., (2013) e Sanchez et al., (2009) evidenciam os efeitos neuroprotetores da VD em pesquisa com animais *in vivo* e *in vitro*. Deste modo, a VD pode induzir o GDNF, sendo os fatores neurotróficos derivados da glia, os quais desempenham função de extrema relevância no processo de regeneração de fibras nervosas lesionadas (WANG et al., 2001).

Na DP, a alfa-sinucleína é encontrada em inclusões intraneuronais chamadas corpos de Lewy, e propõe-se que a alfa-sinucleína forme oligômeros e fibrilas antes de se agregar formar corpos de Lewy. As interações entre certas conformações de alfa-sinucleína e o metabolismo da DA podem causar degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos. O metabolismo da DA gera espécies reativas de oxigênio, que podem acelerar a agregação de alfa-sinucleína, o que por si só pode aumentar a geração de reações tóxicas (MARIES et al., 2003).

A alfa-sinucleína é uma proteína neuronal pré-sináptica ligada do ponto de vista genético e neuropatológico à DP. Acredita-se que as conformações oligoméricas denominadas protofibrilas, são as espécies tóxicas que vão mediar alteração na homeostase celular causando a morte neuronal, por meio de efeitos em vários alvos intracelulares, incluindo a função sináptica (STEFANIS, 2012). Assim a perda de células neuronais dopaminérgicas progressivas na substância negra pars compacta (SNpc) e agregação generalizada da proteína alfa-sinucleína na forma de corpos de Lewy e neuritos de Lewy são as características neuropatológicas da DP (XU et al., 2016).

Apesar da alfa-sinucleína ser um elemento fundamental para a patogênese da DP, são poucos estudos que examinaram os níveis plasmáticos de alfa-sinucleína devido ao nível excepcionalmente baixo de alfa-sinucleína no plasma em comparação com o líquido cefalorraquidiano. Lin et al., (2017) mostraram que os níveis plasmáticos de alfa-sinucleína foram significativamente maiores em pacientes com DP em comparação com controles. Esses dados sugerem que o nível

plasmático de alfa-sinucleína se correlaciona com o declínio cognitivo, mas não com a gravidade motora em pacientes com DP. Assim, a alfa-sinucleína plasmática pode servir como biomarcador para pacientes em risco de declínio cognitivo.

A alfa-sinucleína ( $\alpha$ S) é o principal constituinte dos corpos de Lewy e uma marca patogênica de todas as sinucleinopatias, incluindo DP (MEADE et al., 2019). O(s) processo(s) subjacente(s) à geração de corpos de Lewy e suas moléculas desencadeantes causais ainda não são totalmente compreendidos. A alfa-sinucleína é um componente importante das mutações do gene LB e SNCA ou duplicações/triplicações destes genes são causais para formas hereditárias raras de DP (RIEDERER et al., 2019).

A DP é uma doença neurodegenerativa multifatorial, crônica e progressiva. A alfa-sinucleína, que é o principal componente proteico dos corpos de Lewy, desempenha um papel importante nas características patológicas da DP. No entanto, a função patológica da alfa-sinucleína e os mecanismos moleculares responsáveis pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos ainda são indefinidos. A evidência cumulativa implica que o processamento anormal de alfa-sinucleína pode levar a alterações patológicas na DP (He et al., 2020) como a transmutação patogênica da proteína alfa-sinucleína aberrante em estruturas fibrilares que atua na neurodegeneração na DP (SRINIVASAN et al., 2021).

Determinação nos níveis de alfa-sinucleína em fluidos corporais são, portanto, uma promessa significativa no estabelecimento da alfa-sinucleína como um biomarcador definitivo para DP. No entanto, muitas questões metodológicas ainda precisam ser resolvidas e estudos transversais e de acompanhamento maiores com controles e pacientes com DP devem ser realizados (GANGULY et al., 2021). Várias linhas de evidência implicam a proteína alfa-sinucleína na patogênese da DP e, como tal, há intenso interesse em direcionar alfa-sinucleína para potencial modificação da doença (GROSSO et al., 2022).

Assim, apesar da função fisiológica da alfa-sinucleína ainda não foi completamente entendida, porém, evidências cada vez mais palpáveis comprovam seu papel na liberação vesicular de neurotransmissores, incluindo dopamina (MADINE et al., 2008; BEN GEDALYA et al., 2009; FORTIN et al., 2010; SCOTT et al., 2010). Além da alfa-sinucleína tem sido determinada como responsável pela

regulação fisiológica da produção de dopamina através do intercâmbio com TH (PEREZ et al., 2002; LIU et al., 2008). Assim, a alfa-sinucleína é o maior componente do Corpo de Lewy (SPILLANTINI et al., 1997), estando presente nos neurônios dopaminérgicos dos cérebros de pacientes portadores de DP (SPILLANTINI et al., 1997; CONWAY et al., 2001).

Nos nossos resultados observam-se, que o grupo unicamente com a injeção 6-OHDA exibiu um aumento na expressão de alfa-sinucleína no corpo estriado do lado lesionado (ipsilateral) em relação ao grupo FO do mesmo lado, enquanto os grupos lesionados e tratados com exercício e suplementação de VD apresentaram uma menor marcação de alfa-sinucleína. De tal modo, a alfa-sinucleína possui diversas funções fisiológicas importantes, porém, na vigência do seu excesso e oligomerização ela se torna tóxica para os neurônios, levando à morte destes e consequente progressão da DP. Por fim, diversos estudos com camundongos geneticamente, alterado apontam que a super expressão da proteína alfa-sinucleína pode acarretar contrafações neurais, degeneração axonal e morte celular (KAHLE et al., 2000).

De tal modo, a literatura tem apontado vários mecanismos pelos quais o exercício físico, e suplementação de VD podem promover a neuroplasticidade. Dentre esses está a capacidade de desenvolver neurogênese (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999), angiogênese (AL-JARRAH et al., 2010), alterações na expressão de fatores neurotróficos endógenos (REAL et al., 2013; TUON et al., 2012), de neurotransmissores e receptores (KINTZ et al., 2013; REAL et al., 2010), e em proteínas sinápticas e estruturais (GARCIA et al., 2012; REAL et al., 2015).

Estudos mostram que tanto as enzimas indispensáveis para a síntese do metabólito ativo de VD, 1,25-diidroxicolecalciferol (1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, quanto o receptor de VD (VDR) (KESBY, 2011) encontrar-se presentes no cérebro, indicando um possível papel da VD, na manutenção das funções normais. O VDR é encontrado em diferentes regiões do cérebro, tais como núcleo accumbens, córtex temporal, amígdala, tálamo, neurônios piramidais do hipocampo e sistema olfatório, tanto de ratos como de humanos (HARMS, 2011). A deficiência de VD em múltiplos estágios da vida, podem estar adjunta, com diversos eventos cerebrais adversos (KESBY, 2011).

Ressaltar, os resultados referentes a imunomarcagem de VDR, o grupo unicamente com a injeção 6-OHDA, apresentou uma diminuição na expressão de VDR no corpo estriado do lado lesionado (ipsilateral) em relação ao grupo FO do mesmo lado, enquanto os grupos lesionados e tratados com exercício e suplementação de VD apresentaram uma maior marcação de VDR.

È sabido, que a atividade da VD depende de sua ligação ao receptor da VD, o VDR, que codifica um fator de transcrição nuclear, e a formação do complexo ente a VD (VDR), ativa (1,25 OH dihidroxi-vitamina D) e o seu receptor, e desta forma afeta a expressão de mais de 1000 genes (MOHRI et al., 2009). Portanto, a capacidade do cérebro para sintetizar localmente a forma ativa da VD, 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> bem como, a presença de VDR, sugerem que a VD está envolvida no desenvolvimento e ou funcionamento normal do cérebro (AL-HARBI, KHAN et al.,2017). No SNC, a VD e encontrar-se relacionada na regulação da neurotransmissão, neuroproteção, imunomodulação (Dursun et al., 2011), bem como na regulação da excitotoxicidade neuronal mediada pelo cálcio e redução do estresse oxidativo (MPANDZOU et al., 2016).

Diante deste exposto o envolvimento da VD nas funções cerebrais é evidenciado pela presença da enzima 25(OH)D<sub>3</sub>-1 $\alpha$ -hidroxilase, e dos receptores de VD (RVD), principalmente no hipotálamo e nos neurônios dopaminérgicos da substância negra (EYLES et al., 2005; WRZOSEK et al., 2013), sugerindo-se, inclusive, uma relação entre insuficiência de 25(OH) com o desenvolvimento ou a progressão da DP.

Assim, os níveis reduzidos de VD nos pacientes com DP e as altas concentrações de receptores desta vitamina nas células da substância negra, sugerem que a VD pode desempenhar um papel importante na proteção das células da substância negra e pode ser um fator relevante na prevenção da DP (RAGLIONE, NACMIAS, 2001; EVATT et al., 2008, NEWMARK, NEWMARK 2007). Portanto, um nível adequado de VD pode contribuir para um funcionamento correto das células cerebrais e para a redução do risco da DP.

Portanto, acredita-se que o exercício físico regular exerça um efeito positivo sobre a resposta neuroquímica (Aguiar et al., 2007; Tuon et al., 2012; Costa, 2016), comportamental (Petzinger et al., 2007, Costa, 2016), mitocondrial (Bloomer et al.,

2008; Elokda et al., 2010) e inflamatória (MILLER et al., 2012; TAN, 2012). Com relação a VD os achados despontam seus efeitos positivos bem como a utilização da VD, por exercer mecanismos de ação da neuroproteção mediando a inibição do estresse oxidativo, da ativação microglial e na neurotoxicidade mediada pelo glutamato (CASS et al., 2014; CASS et al., 2012; KIM et al., 2006; LIMA, 2017; NAVEILHAN et al., 1996; ORME et al., 2013; SMITH et al., 2006).

Estudos demonstram uma prevalência significativamente maior de hipovitaminose na DP versus controles saudáveis e corroboram um possível papel da insuficiência de VD na DP (EVATT et al., 2008). Um estudo de revisão sistemática e meta-análise (Luo et al., 2018) mostrou que níveis séricos de VD estão inversamente associados com o risco gravidade da DP. Pacientes com DP têm níveis mais baixos de VD do que os controles saudáveis e as concentrações de VD estão negativamente correlacionadas com o risco e a gravidade da DP. Além disso, concentrações mais altas de VD estão ligadas a uma melhor função cognitiva e humor em pacientes com DP. Tendo em vista os efeitos neuroprotetores da VD e a estreita associação entre VD e neurotransmissão dopaminérgica, estudos clínicos acerca da suplementação de VD em pacientes com DP fazem-se necessários (LV et al., 2020).

Sabe que a VD é importante para o desenvolvimento do cérebro. Todos esses estudos acima citados, mostram uma elevada incidência de deficiência de VD em pacientes com DP em comparação com a população controle. Isso corrobora o efeito neuroprotetor da VD, exercido pela ação de fatores neurotróficos, regulação do crescimento nervoso ou proteção contra citotoxicidade. A deficiência de VD parece estar relacionada à gravidade e progressão da doença. Além disso, o risco de queda tem sido associado a níveis mais baixos de VD na DP. Considerando o balanço positivo entre os benefícios potenciais contra seus riscos limitados, a suplementação de VD para pacientes com DP provavelmente será considerada uma estratégia terapêutica a ser levada em conta como tem sido recentemente apregoadado (PIGNOLO et al., 2022).

Apesar do consenso que a VD desempenha um papel neuroprotetor e neurotrófico no cérebro estudos clínicos randomizados e bem desenhados são necessários para confirmar e elucidar melhor o efeito benéfico da VD na DP

(RIMMELZWAAN et al., 2016). Além disso, polimorfismos do gene do receptor da VD (VDR) influenciam a suscetibilidade à DP, dentre outras (GATTO et al., 2016).

A VD é um secoesteróide lipossolúvel que exerce seus efeitos ligando-se ao receptor da VD (VDR), através do qual modula direta e indiretamente a expressão de centenas a milhares de genes. A constatação de que a alta prevalência de deficiência de VD observada na DP juntamente com a descoberta de que o VDR e a 1 $\alpha$ -hidroxilase, a enzima que converte a VD em sua forma ativa, são altamente expressos na substância negra, levaram à hipótese de que níveis inadequados de VD circulante podem levar à disfunção ou morte celular na substância negra. Um dos achados mais consistentes na literatura é a associação inversa entre o nível sérico de VD e a gravidade dos sintomas motores em estudos transversais. Assim, dados os inúmeros benefícios potenciais e riscos limitados, a avaliação do nível de VD em pacientes com DP e suplementação para aqueles com deficiência e insuficiência parece justificada (FULLARD; DUDA, 2020).

Como já discutido, a alfa-sinucleína localizada no terminal pré-sináptico, modula as funções sinápticas. Evidências demonstram que oligômeros de alfa-sinucleína, formados no início da agregação, são citotóxicos portanto, estão relacionados a doenças neurodegenerativas. Além disso, dados recentes mostram que a VD pode reduzir a neurotoxicidade da alfa-sinucleína e esse efeito pode ser atribuído à menor quantidade de oligômeros de alfa-sinucleína produzida por VD. Os resultados mostram também que a VD pode recuperar a quantidade de liberação do neurotransmissor durante a exocitose induzida por oligômeros alfa-sinucleína, evidenciando o papel neuroprotetor da VD através da inibição da agregação de alfa-sinucleína (ZHANG et al., 2022).

Portanto, tomados em conjunto, esses resultados podem justificar, pelo menos em parte, as implicações positivas dos modelos de treinamento físico e a associação da VD utilizados nesse estudo sobre a patogenicidade cerebral da DP induzida por 6-OHDA. Observamos uma diminuição significativa das injúrias e efeitos deletérios em ratos hemiparkinsonianos, devido a ações antioxidantes e relacionados a ação neuroprotetora.

**Quadro 3** – Representação esquemática dos efeitos do exercício físico esteira e suplementação de VD nas alterações comportamentais (testes do campo aberto, rotarod e cilindro) em ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

	Apomorfina	Campo Aberto			Rota Rod	Cilindro Ambas as Patas	Distância Percorrida
		Nº Cruzamentos	Nº Rearings	Nº Grooming			
FO S/E <sup>*</sup>	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
FO C/E <sup>*</sup>	↔	↑	↑	↔	↓	↔	↔
6-OHDA S/E <sup>#</sup>	↑	↓	↓	↑	↑	↔	↓
6-OHDA C/E <sup>#</sup>	↓	↑	↑	↓	↓	↔	↑
6-OHDA S/E VD <sup>#</sup>	↓	↑	↑	↓	↓	↔	↑
6-OHDA C/E + VD <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 exercício físico esteira e suplementação de VD em alterações comportamentais (testes de Y-maze e reconhecimento de objeto) em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

	Y-Maze	Reconhecimento de Objeto
FO S/E <sup>*</sup>	↔	↔
FO C/E <sup>*</sup>	↔	↔
6-OHDA S/E <sup>*</sup>	↓	↓
6-OHDA C/E <sup>#</sup>	↑	↑
6-OHDA S/E VD <sup>#</sup>	↑	↑
6-OHDA C/E + VD <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 5** – Representação esquemática dos efeitos do exercício físico esteira e suplementação de VD nos níveis de dopamina (DA) e DOPAC no corpo estriado de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

		Monoamina e Metabólitos	
		DA	DOPAC
FO C/E *		↔	↔
6-OHDA S/E*		↓	↔
6-OHDA C/E #	S/E	↔	↔
6-OHDA S/E VD#		↑	↑
6-OHDA C/E + VD #		↑	↑

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 exercício físico esteira e suplementação de VD sobre a peroxidação lipídica (TBARS) e nos níveis de NITRITO e GSH no corpo estriado de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

Grupos	TBARS			NITRITO			GSH	
	CPF	HC	CE	CPF	HC	CE	CPF	HC
FO C/E*	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
6-OHDA S/E*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓
6-OHDA C/E	↔	↔	↔	↓	↓	↓	↔	↔
6-OHDA S/E VD	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑
6-OHDA C/E + VD#	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↔

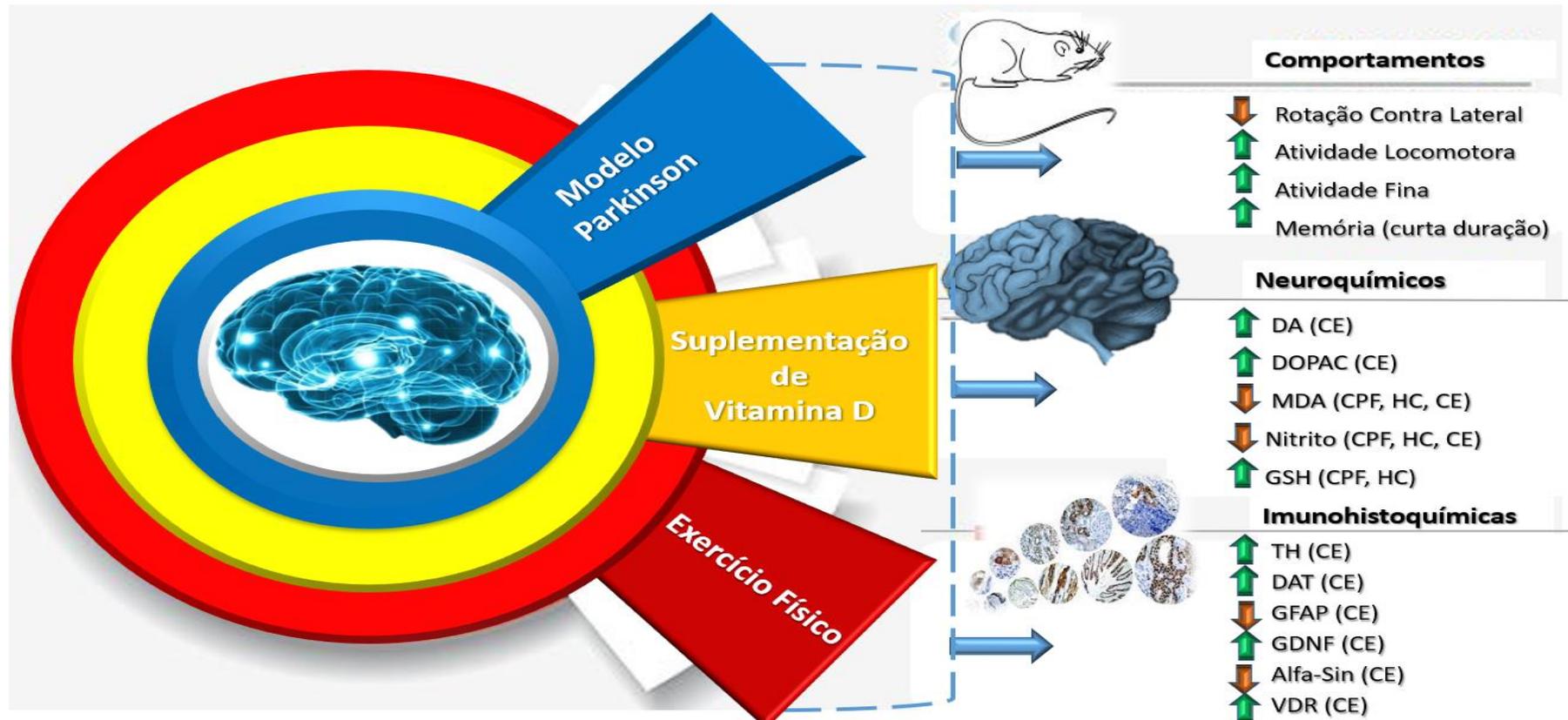
Fonte: Elaborado pelo autor. Grupos comparados com FO sem exercício (S/E) (\*) ou 6-OHDA sem exercício (S/E) (#). Déficit ou diminuição (↓) melhora ou aumento (↑); ausência de efeitos estatisticamente significativos (↔).

**Quadro 7** – Representação esquemática dos efeitos do exercício físico esteira e suplementação de VD sobre imunomarcagem de TH, DAT, GFAP, GDNF, alfa-sinucleína e receptor de VD em corpo estriado de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA

Grupos	TH	DAT	GFAP	GDNF	Alfa-sin	VRD
FO C/E *	↔	↔	↔	↔	↔	↔
6-OHDA S/E *	↓	↓	↑	↓	↑	↔
6-OHDA VD#	↑	↑	↓	↔	↓	↔
6-OHDA C/E#	↑	↑	↓	↑	↓	↔
6-OHDA C/E + VD #	↑	↑	↓	↑	↓	↔

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(↔).

**FIGURA 62** - Modelo esquemático dos efeitos do exercício físico esteira e suplementação de VD no modelo experimental de DP induzido por 6-OHDA



No modelo esquemático pode-se observar que a suplementação de VD e **Exercício Físico**, apresentam um efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade da 6-OHDA em ratos, evidenciado por meio da redução de MDA, Nitrito, e aumento de GSH. A suplementação de VD e **Exercício Físico** também aumentou a população neuronal no corpo estriado, aumentando as concentrações de DA, bem como, a imunomarcagem para TH e DAT, e melhorou os sintomas motores e não motores. Legenda - CPF: Córtex pré-frontal; HC: Hipocampo; CE: Corpo estriado; Alfa-Sin: DA: Dopamina; DAT: Transportador de dopamina; GSH: Glutaciona reduzida; GFAP; GDNF; MDA: Malondialdeído; TH: Tirosina hidroxilase; VDR: Receptor de VD.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o protocolo de exercício físico esteira, com intensidade moderada, e suplementação de VD, por 21 dias, foram efetivos no abrandamento das desordens resultantes da exposição de animais a lesão estriatal unilateral por 6-OHDA por:

- Antagonizar as alterações comportamentais e cognitivas;
- Reverter a diminuição das concentrações estriatais de DA e DOPAC;
- Reverter o aumento do estresse oxidativo;
- Aumentar os níveis de GSH;
- Proteger contra a diminuição nas imunomarcações para TH e DAT observadas no CED do animal lesionado;
- Proteger contra aumento nas imunomarcações para GFAP e alfa-sinucleína observadas no CED do animal lesionado;
- Proteger contra a diminuição nas imunomarcações para GDNF e VDR observadas no CED do animal lesionado.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os nossos resultados sugerem que o exercício físico e suplementação da VD, em associação ou de forma isolada, apresentam um efeito neuroprotetor nas alterações comportamentais, neuroquímicas e imunohistoquímicas na DP, podendo ser potencialmente útil para tratamento desta patologia. Portanto, é possível novas perspectivas no aspecto clínico no que se refere a associação do exercício físico com a suplementação de VD para o tratamento farmacológico.

## 9 REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D. *et al.* Depression in Parkinson disease-- epidemiology, mechanisms and management. **Nat Rev Neurol**, v. 8, n. 1, p.35-47. 2012.
- ACSM. ACSM's Exercise for Older Adults. Lippincott Williams & Wilkins. 256p. 2013.
- AGUIAR, A. S., PINHO, R. A. Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral. **Ver Bras Med Esporte**, v.13, p. 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**, v.115, n. 12, p. 1643-50. 2008.
- AGUIAR, A. S. JR. *et al.* Intense Exercise Induces Mitochondrial Dysfunction in Mice Brain. **Neurochem Res**, v. 33, p.51-8. 2008.
- AGUIAR, A. S. *et al.* Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain research bulletin**, v. 79, n. 6, p. 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, 215p. 2009.
- 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**, v. 29, n. 12, p. 16–27. 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**, v. 132, p. 560-567. 2011.
- AGUIAR JUNIOR, A.S. **O exercício físico como agente modificador da doença de Parkinson e das discinesias induzidas por L-DOPA: evidência obtida em modelos experimentais.** Tese (Doutorado em Farmacologia). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. UFSC, tese doutorado – Florianópolis, SC, p. 139. 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**, v. 37, p. 516-26. 2012.

AL-JARRAH, M. *et al.* Endurance exercise training promotes angiogenesis in the brain of chronic/ progressive mouse model of Parkinson's Disease.

**NeuroRehabilitation**, v. 26, n. 4, p.369-73. 2010.

ANDERSON, C., CHECKOWAY, H., FRANKLIN, G. M., BERESFORD, S., SMITH-WELLER, T., & Swanson, P. D. Dietary factors in Parkinson's disease: the role of food groups and specific foods. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. V. 14, n. 1, p. 21-27.1999.

ANTUNES, M. S. *et al.* Hesperidin protects against behavioral alterations and loss of dopaminergic neurons in 6-OHDA-lesioned mice: the role of mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 1, p. 153–167, 1 jan. 2021.

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

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

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, p. 79. 2012.

ARAÚJO, DAYANE P.; NOGUEIRA, PATRÍCIA C.N.; SANTOS, ALAN DIEGO C.; Costa, Roberta de Oliveira; DE LUCENA, JALLES D.; JATAÍ GADELHA-FILHO, CARLOS VINICIUS; LIMA, FRANCISCO ARNALDO V.; NEVES, KELLY ROSE T.; LEAL, LUZIA KALYNE ALMEIDA M.; SILVEIRA, EDILBERTO R.; VIANA, GLAUCE S.B.. *Aspidosperma pyrifolium* Mart: neuroprotective, antioxidant and anti-inflammatory effects in a Parkinson's disease model in rats. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 1, p. 1. 2018.

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

ARON, Liviu; KLEIN, Rüdiger. Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. **Trends in neurosciences**, v. 34, n. 2, p. 88-100. 2011.

ASAKAWA, T.; FANG, H.; SUGIYAMA, K.; NOZAKI, T.; HONG, Z.; YANG, Y. et al., Animal behavioral assessments in current research of Parkinson's disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 65, p. 63-94. 2016.

BAILLET, Athan et al. Efficacy of cardiorespiratory aerobic exercise in rheumatoid arthritis: meta-analysis of randomized controlled trials. **Arthritis care & research**, v. 62, n. 7, p. 984-992, 2010.

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

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.

BÉRAUD, D.; MAGUIRE-ZEISS, K. A. Misfolded  $\alpha$ -synuclein and Toll-like receptors: therapeutic targets for Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.** v. 1, p. 17-20. 2012.

BERRIOS, G. E. Introdução à "Paralisia agitante", de James Parkinson (1817). *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental*, v. 19, n. 1, p. 114– 12. 2016.

BEN GEDALYA, Tziona et al.  $\alpha$ -Synuclein and Polyunsaturated Fatty Acids Promote Clathrin-Mediated Endocytosis and Synaptic Vesicle Recycling. **Traffic**, v. 10, n. 2, p. 218-234. 2009.

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

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

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

- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS J.**, v. 279, n. 7, p. 1156-1166, 2012.
- BALL, N. et al. Parkinson's Disease and the Environment. **Frontiers in Neurology**, v. 10, mar. 2019.
- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v. 2, p. 124-129. 2008.
- BLESA, Javier et al. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 9, p. 91. 2015.
- BLESA, Javier; PRZEDBORSKI, Serge. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 8, p. 155. 2014.
- BLOOMER, Richard J.; FISHER-WELLMAN, Kelsey H. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. **Gender medicine**, v. 5, n. 3, p. 218-228. 2008.
- BINDA, K. H. et al. Antinociceptive effects of treadmill exercise in a rat model of Parkinson's disease: the role of cannabinoid and opioid receptors. **Brain Research**, n. 11, v 40. 2019.
- BIGNAMI A. Discussions in Neuroscience. **Elsevier Science Publishers**, Amsterdam, v. 8, p. 1-45. 1991.
- BJORKLUND, A., C. ROSENBLAD, C. WINKLER, AND D. KIRIK. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis.** v. 4, p. 186-200. 1997.
- BLANDINI, Fabio et al. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 397-405. 2007.
- BLUM, David et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, v. 65, n. 2, p. 135-172, 2001.

BREWER, L.D. et al. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. **J Neurosci**, v. 21, n.1, p. 98-108. 2001.

BRESJANAC, Mara; ANTAUER, Gregor. Reactive astrocytes of the quinolinic acid-lesioned rat striatum express GFR $\alpha$ 1 as well as GDNF in vivo. **Experimental neurology**, v. 164, n. 1, p. 53-59. 2000.

BERRIDGE, Kent C. et al. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. **BMC biology**, v. 3, n. 1, p. 1-16. 2005.

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

BOELEN, M. The Role of Rehabilitative Modalities and Exercise in Parkinson's Disease. **Dis Mon**. v. 53, p. 259-264. 2007.

BOIX, J.; PADEL, T.; PAUL, G. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice—Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. **Behavioural brain research**, v. 284, p. 196-206. 2015.

BOELEN, M. The Role of Rehabilitative Modalities and Exercise in Parkinson's Disease. **Dis Mon**. v. 53, p. 259-264. 2007.

BORONAT-GARCÍA A, GUERRA-CRESPO M, DRUCKER-COLÍN R. Historical perspective of cell transplantation in Parkinson's disease. **World J Transplant**. 7(3): 179-192. 2017.

BOUCHARD, C. E.; SHEPHARD, R. J. Physical activity, fitness, and health: the model and key concepts. **Physical Activity, Fitness, and Health, International Proceedings and Consensus Statement**.1994.

BOUILLON, Roger et al. Vitamin D metabolism and action. **Osteoporosis international**, v. 8, p. 13. 1998.

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

- 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. p.132. 2008.
- BRANDT, M. *et al.* Decision-making impairments in patients with Parkinson's disease. **Behav Neurol**, v. 15, p. 77-85. 2004.
- BRÁS, I. C. *et al.* Synucleinopathies: Where we are and where we need to go. **Journal of Neurochemistry**, v. 28, n. 2, p. 220–223, jan. 2020.
- BREESE, G. R.; TRAYLOR, T. D. Depletion of brain noradrenaline and dopamine by 6-hydroxydopamine. **Br J Pharmacol**, 42(1):88-99, 1971.
- BREWER, L.D. *et al.* Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type calcium channel expression in hippocampal neurons. **J Neurosci**, v. 21, n. 1, p. 98-108. 2001.
- BROWN, B. S.; VAN HUSS, W. Exercise and rat brain catecholamines. **J Appl Physiol**, v. 34, p. 665-9. 1973.
- BROWN, B. S. *et al.* Chronic response of rat brain norepinephrine and serotonin levels to endurance training. **J Appl Physiol**, v. 46, p. 19-23. 1979.
- 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**, v. 1801, p. 924–929. 2010.
- CAI, Q. *et al.* Vitamin D and adaptation to dietary calcium and phosphatedeficiencies increase intestinal plasma membrane calcium pump gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 1345-1349. 1993.
- CAMPOS, M Tradução, Adaptação Cultural e Validação do Parkinson's Disease Quality of Life-questionnaire (PDQL) para o português falado no Brasil, o PDQL-BR. UFU, Uberlândia. 2010.
- CARVEY, P. M.; PUNATI, A.; NEWMAN, M. B. Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. **Cell Transplant**, v. 15, p. 239-50. 2006.

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

CASS, W.A., M.E. HARNED, AND S.L. Bailey. Enhanced effects of 6-hydroxydopamine on evoked overflow of striatal dopamine in aged rats. **Brain Res.** v. 938, p. 29-37. 2002.

CASS, W.A., AND M.W. MANNING. GDNF protection against 6-OHDA-induced reductions in potassium-evoked overflow of striatal dopamine. **J Neurosci.** v. 19, p. 1416-23. 1999.

CHOTIBUT, T.; APPLE, D.M.; JEFFERIS, R.; SALVATORE, M.F. Dopamine Transporter Loss in 6-OHDA Parkinson's Model Is Unmet by Parallel Reduction in Dopamine Uptake. **PLOS ONE**, v. 7, n. 12. 2012.

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

CONNOR, B., AND M. DRAGUNOW. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. **Brain Res Brain Res Ver**, v. 27, p. 1-39. 1998.

COSTA, R. O.; GADELHA-FILHO, C. V.; COSTA, A. E. M.; FEITOSA, M. L.; ARAUJO, D. P.; LUCENA, J. D.; AQUINO, P. E. A.; LIMA, F. A.; NEVES, K. R. T.; VIANA, D. G. S. B. The Treadmill Exercise Protects against Dopaminergic Neuron Loss and Brain Oxidative Stress in Parkinsonian Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1-10. 2017.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci**, v. 25, p. 295-301. 2002.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N. C.; CHRISTIE, L. Exercise builds brain health: An interplay of central and peripheral factors. **Trends Neurosci**, v. 30, p. 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**, v. 11, p. 100-109. 2012.

COSTA, R. O. C. Avaliação dos efeitos do exercício físico na lesão estriatal unilateral por 6-ohda em ratos. 2016. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

CEKIC, M.; SAYEED, I.; STEIN, D. G. Combination treatment with progesterone and vitamin D hormone may be more effective than monotherapy for nervous system injury and disease. **Front. Neuroendocrinol.** v.30, p. 158–172, 2009.

CHAO, O. Y. *et al.* Intranasally applied L-DOPA alleviates parkinsonian symptoms in rats with unilateral nigro-striatal 6-OHDA lesions. **Brain research bulletin**, v. 87, n. 2-3, p. 340–5. 2012.

CHEN, J. F. The adenosine A(2A) receptor as an attractive target for Parkinson's disease treatment. **Drug News Perspect.**, v. 16, p. 597-604. 2003.

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

CHEN, C.M.; LIU, J.L.; WU, Y.R.; CHEN, Y.C.; CHENG, H.S.; CHENG, M.L.; CHIU, D.T. Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis.**, v. 33, p. 429-435. 2009.

CHO, HAN-SAM. *et al.* Treadmill exercise alleviates short-term memory impairment in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Journal of exercise rehabilitation**, v. 1, p. 354-361. 2013.

CHAUDHURI, K. R., HEALY, D. G., & SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 3, p. 235-245. 2006.

CHIA, S. J.; TAN, E. K.; CHAO, Y. X. Historical perspective: Models of Parkinson disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, 2020.

CRUISE, K. E., BUCKS, R. S., LOFTUS, A. M., NEWTON, R. U., PEGORARO, R., & THOMAS, M. G. Exercise and Parkinson's: benefits for cognition and quality of life. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 123, n. 1, p. 13-19. 2011.

CULLEN, T. J. *et al.* A postmortem study of the mediodorsal nucleus of the thalamus in schizophrenia. **Schizophrenia research**, v. 60, n. 2-3, p. 157-166. 2003.

CULLEN K.M. Antigen retrieval method for glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry: implications on neuropathological studies. **Brain Pathol.** v. 7, p.1179.1997.

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**, v.87, n. 4, p. 451-63. 2007.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, E. C.; FERRO, M. M.; *et al.* Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. **Behavioral Brain Research**, v. 189, p. 364-372. 2008.

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

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

DAVID, F.J. *et al.* Progressive resistance exercise and Parkinson's disease: a review of potential mechanisms. **Parkinsons Dis.** v. 124, p. 527.2012.

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**, v. 235, n. 1, p. 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**, v. 41, p. 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** . v. 34, p. 729-738. 2009.

DEUMENS, RONALD; BLOKLAND, ARJAN; PRICKAERTS, JOS. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental neurology**, v. 175, n. 2, p. 303-317, 2002.

DIBBLE, L.E., HALE, T.F., MARCUS, R.L., GERBER, J.P. AND LASTAYO, P.C. High intensity eccentric resistance training decreases bradykinesia and improves

Quality Of Life in persons with Parkinson's disease: a preliminary study.

**Parkinsonism Relat Disord**, v.15, n. 10, p. 752-7. 2009.

DI BIASE, L.; FASANO, A. Low-frequency deep brain stimulation for Parkinson's disease: Great expectation or false hope? **Movement Disorders**, v. 31, n. 7, p. 962–967. 2016.

DICKSON, D. W. Neuropathology of Parkinson disease. **Parkinsonism Relat Disord.**, 2017.

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

DING, H. *et al.* Unrecognized vitamin D3 deficiency is common in Parkinson disease: Harvard Biomarker Study. **Neurology**, v. 81, n. 17, p. 1531-7. 2013.

DHESI, J. K. *et al.* Neuromuscular and psychomotor function in elderly subjects who fall and the relationship with vitamin D status. **Journal of bone and mineral research**, v. 17, n. 5, p. 891-897. 2002.

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

.DOMINGUES MR, ARAÚJO CLP, GIGANTE DP. Conhecimento e percepção sobre exercício físico em uma população adulta urbana do sul do Brasil. **Caderno Saúde Pública**. v. 20, p. 204-15. 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**, v. 46, n. 3, p. 208-9. 1957.

EARHART, G.M., DUNCAN, R.P., HUANG, J.L., PERLMUTTER, J.S. AND PICKETT, K.A. Comparing interventions and exploring neural mechanisms of exercise in Parkinson disease: a study protocol for a randomized controlled trial. **BMC Neurol**, v. 15, n. 1, p. 9. 2015.

EDDLESTON M, MUCKE L. Molecular profile of reactive astrocytesimplications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**. v. 54, p. 15-36.1993.

- EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **J. Neurosci. Methods**, v. 139, p. 121–143, 2004.
- ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behav Brain Res**, v. 31, n. 1, p. 47-59, 1988.
- ENG L. F. & GHIRNIKAR R.S. GFAP and astrogliosis. **Brain Pathol.**v. 4, p. 229-237. 1994.
- EYLES, D. W., S. SMITH, R. KINOBE, M. HEWISON AND J. J. MCGRATH. "Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain." **J Chem Neuroanat**, v. 29, n. 1, p. 21-30. 2005.
- EVATT, M.L. et al. High prevalence of hypovitaminosis D status in patients with early Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 68, n. 3, p. 314-9. 2011.
- EVATT ML, DELONG MR, KHAZAI N, ROSEN A, TRICHE S, TANGPRICHA V. Prevalence of Vitamin D Insufficiency in Patients With Parkinson Disease and Alzheimer Disease. **Arch Neurol**. v. 65, n. 10, p. 1348–1352. 2008.
- EYLES, D. W. et al. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alphahydroxylase -in human brain. **J. Chem. Neuroanat.**, v. 29, p. 21-30, 2005.
- FAHN S, SULZER D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **NeuroRx**. v. 1, n. 1, p. 139-54. Jan. 2004.
- FALVO, M.J., SCHILLING, B.K. AND EARHART, G.M. Parkinson's disease and resistive exercise: rationale, review, and recommendations. **Mov Disord**, v. 23, n.1, p. 1-11. 2008.
- FERNANDEZ, H. H. Updates in the medical management of Parkinson disease. **ClevelandClinic Journal of Medicine**, v. 79, p. 28-35. 2012.
- FERNANDES FILHO, J. A Prática da Avaliação Física: SHAPE-RJ, 2003.
- FERNANDES, R. A., GODOGNO, J. S., CAMPOS, E. Z., RODRIGUES, E. Q., SOUSA, S. D., BALIKIAN JÚNIOR, P. & FREITAS JÚNIOR, I. F. Consumo máximo de oxigênio e fatores de risco cardiovascular em adultos jovens. **Revista Brasileira de Atividade Física & Saúde**, v. 14, p. 96-103, 2012.

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

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**, v. 148, p. 78-87. 2005.

FILIPPIN, N. T. *et al.* Qualidade de vida de sujeitos com doença de Parkinson e seus cuidadores. **Fisioterapia em Movimento**, Curitiba, v. 27, n. 1, p. 57-66. 2014.

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

FOX, John; WEISBERG, Sanford. Multivariate linear models in R. **An R Companion to Applied Regression**. Los Angeles: Thousand Oaks, 2011.

FLOYD, Robert A. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 222, n. 3, p. 236-245. 1999.

FRANCO, R. *et al.* Oxidative stress and redox signalling in Parkinson's disease. 1. ed. London: **Royal Society of Chemistry (Great Britain)**, 2017.

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

FRIEDLANDER, Robert M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 14, p. 1365-1375. 2003.

FULLARD ME AND DUDA JE. A Review of the Relationship Between Vitamin D and Parkinson Disease Symptoms. **Front. Neurol.** v. 11, p. 454. 2020.

FULLARD ME AND DUDA JE. A Review of the Relationship Between Vitamin D and Parkinson Disease Symptoms. **Front. Neurol.** v. 11, p. 454. 2020.

GALVAN, A.W., T. Pathophysiology of parkinsonism. **Clin Neurophysiol**, v. 119, n. 7, p. 1459-74. 2008.

GALLO, PM; MCISAAC, TL; GARBER, C. Walking economy during cued versus non-cued self-selected treadmill walking in persons with Parkinson's disease. **J**

**Parkinsons Dis.** v. 4, p. 705-16. 2014.

GALLO, L.H.; ZULUAGA, C.F.A.; GOBBI, S. Parâmetros e Princípios da Programação de Exercício Físico. In: COELHO, F.G.M; GOBBI, S; COSTA, J.L.R; GOBBI, L.T.B. (Org.). Exercício Físico no Envelhecimento Saudável e Patológico: da teoria à prática. Curitiba - **PR: CRV**, v. 1, p. 83-95, 2013.

GANGULY U, SINGH S, PAL S, PRASAD S, AGRAWAL BK, SAINI RV, CHAKRABARTI S. Alpha-Synuclein as a Biomarker of Parkinson's Disease: Good, but Not Good Enough. **Front Aging Neurosci.** v. 8, n 13, Jul. 2021.

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.

GATTO NM, PAUL KC, SINSHEIMER JS, BRONSTEIN JM, BORDELON Y, RAUSCH R, RITZ B. Vitamin D receptor gene polymorphisms and cognitive decline in Parkinson's disease. **J Neurol Sci**, v.15, v. 370, p. 100-106, Nov. 2016.

GEORGIEVSKA, B. *et al.* Neuroprotection in the rat Parkinson model by intrastriatal GDNF gene transfer using a lentiviral vector. **Neuro Report**, v. 13, p. 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**, v. 103, p. 987-1041. 1996.

GEZEN-AK, D. *et al.* Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease. *Tohoku J. Exp. Med.*, v. 212, n. 3, p. 275-282, 2007.

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

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

GREALISH, S.; MATTSSON, B.; DRAXLER, P.; BJÖRKLUND, A. Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6

hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 12, p. 2266-2278, 2010.

GIL, A.; PLAZA-DIAZ, J.; MESA, M. D. Vitamin D: Classic and novel actions. **Annals of nutrition and metabolism**, Spain, v. 72, n. 2, p. 87-95, Mar. 2018.

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**, v. 256, p. 61-71. 2014.

GOEDERT M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, p. 492-501. 2001.

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

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.

GONÇALVES, V. C. *et al.* Propolis as a potential disease-modifying strategy in parkinson's disease: Cardioprotective and neuroprotective effects in the 6-oh<sup>191</sup> model. **Nutrients**. v. 12, n. 6, p. 1551, 1 jun. 2020.

GONZALEZ-APARICIO, R., FLORES, J. & Fernandez-Espejo, E. Antiparkinsonian trophic action of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor 1 is enhanced after co-infusion in rats. **Experimental Neurology**. v. 226, n. 1, p. 136-147. 2010.

GORELL, J. M., JOHNSON, C. C., RYBICKI, B. A., PETERSON, E. L., KORTSHA, G. X., BROWN, G. G., RICHARDSON, R. J. Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease. **Neurology**. v. 48, n. 3, p. 650-658. 1997.

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

GULLEY, Margaret L. et al. Clinical laboratory reports in molecular pathology. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 131, n. 6, p. 852-863, 2007.

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**, v. 62, n. 12, p. 1353-62. 2007.

HAJOS, F.; KALMAN, M. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. **Experimental brain research**, v. 78, n. 1, p. 164-173, 1989.

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

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

HARMS, L.R, et al. Vitamin D and the brain. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.**, Nova Iorque, v. 25, n. 4, p. 657-9. 2011.

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

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

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

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

HE S, ZHONG S, LIU G, YANG J. Alpha-Synuclein: The Interplay of Pathology, Neuroinflammation, and Environmental Factors in Parkinson's Disease. **Neurodegener Dis**. v. 20, n. 2-3, p. 55-64. 2020.

HE S, ZHONG S, LIU G, YANG J. Alpha-Synuclein: The Interplay of Pathology, Neuroinflammation, and Environmental Factors in Parkinson's Disease.

**Neurodegener Dis.** v. 20, n. 2-3, p. 55-64. 2020.

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

HILARY GROSSO JASUTKAR, STEPHANIE E. OH,<sup>1</sup> AND M. MARAL MOURADIAN. Therapeutics in the Pipeline Targeting  $\alpha$ -Synuclein for Parkinson's Disease.

**Pharmacol Ver.** v. 74, p. 207–237, January. 2022.

HIRSCH, M. A.; FARLEY, B. G. Exercise and neuroplasticity in people living with Parkinson's disease. **European Journal of Physical Rehabilitation Medicine**, v. 45, p. 215-29. 2009.

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

HOLICK, M.F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. **Nutr Rev**, v. 66, n. 10, p. 182-94. 2008.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* v. 357, p. 266–281. 2007.

HOLICK, M.F. Vitamin D. In: M.E.S. Shils, Moshe; Ross, A. Catharine; Caballero, Benjamin; Cousins, Robert J. (Editor), **Modern Nutrition in Health and Disease**, v. 1, p. 377-398. 2006.

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

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

HOLICK MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. **J. Clin. Invest.** v.116, n. 8, p. 2062-72. 2006.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. *Agência IBGE de Notícias* Rio de Janeiro: IBGE, 2018. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/18469-expectativa-de-vida-do-brasileiro-sobe-para-75-8-anos>>. [www.iess.org.br/envelhecimento2013](http://www.iess.org.br/envelhecimento2013)

JAIN, Liza; BENKO, Rebecca; SAFRANEK, Sarah. **Which drugs work best for early Parkinson's disease?**. 2012.

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

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

JENNER, P. Wearing off, dyskinesia, and the use of continuous drug delivery in Parkinson's disease. **Neurol Clin**. v.31, n. 3, p.17-35. 2013.

JOHNSON, M. E.; BOBROVSKAYA, L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. **Neuro Toxicology** v.46, p. 101-116. 2015.

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**, v. 36, p. 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**, v. 82, p. 449-457. 2002.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; SONG, C.; BERRIDGE, K.C.; ANN, M.; GRAYBIEL.; FENTRESS, J. C. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45, 2016.

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

KALIA, L.V., LANG, A.E. Parkinson's disease. **The Lancet**; v. 386, p. 896–912. 2015.

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

KALMAN, M.; HAJOS, F. Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. **Experimental brain research**, v. 78, n. 1, p. 147-163. 1989.

JOHNSON, M. E.; BOBROVSKAYA, L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene-environment interactions. **Neuro Toxicology**, v.46, p. 101-116. 2015.

KANG, S. S. et al.  $\alpha$ -Synuclein stimulation of monoamine oxidase-B and legumain protease mediates the pathology of Parkinson's disease. **The EMBO journal**, 2018.

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.

KAVYA, Ramkumar et al. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 4, p. 280-294. 2006.

KEARNS, C.M., W.A. CASS, K. SMOOT, R. KRYSCIO, AND D.M. GASH. GDNF protection against 6-OHDA: time dependence and requirement for protein synthesis. **J Neurosci**. v. 17, p. 7111-8. 1997.

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

KENBORG, L. et al. Outdoor work and risk for Parkinson's disease: a population-based case-control study. **Occup Environ Med**, 68(4): 273-8.2011.

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

KESBY, J.P., et al. The effects of vitamin D on brain development and adult brain function. **Mol Cell Endocrinol**. v. 5, n. 347, p. 121-7, Londres. 2011.

KNEKT, P. Serum vitamin D and the risk of Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 67, n. 7, p. 808-11.2010.

KIM, Y.S. *et al.* Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport**, v. 13, n. 9, p. 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**, v. 45, n. 5, p. 357-65. 2010.

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**, v. 45, n. 5, p. 357-65, 2010.

KIM G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Experimental neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325-340, 2015.

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

KIM, J. E. *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D3 level may be associated with olfactory dysfunction in de novo Parkinson's disease. **Journal of Clinical Neuroscience**, Coreia do Sul, v. 8, n. 3, p. 1-5, ago. 2018.

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

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

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

- KODUAH, P.; PAUL, F.; DORR, J. Vitamin D in the prevention, prediction and treatment of neurodegenerative and neuroinflammatory disease. **APMA Journal**, v. 8, p. 313-325, Nov. 2017.
- HONG, Y. J. et al. Association between Bsm1Poly morphism in Vitamin D Receptor Gene and Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in Korean Population. **Endocrinol Metab**, Seoul, v. 30, n. 4, p. 469–474, dez. 2015.
- KUOPIO, A.M., MARTTILA, R.J., HELENIUS, H., TOIVONEN, M. AND RINNE, U.K. The quality of life in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 15, n. 2, p. 216-23. 2000.
- KLEINER, A; GALLI, M; GAGLIONE, M; HILDEBRAND, D; SALE, P; ALBERTINI, G et al. The Parkinsonian Gait Spatiotemporal Parameters Quantified by a Single Inertial Sensor before and after Automated Mechanical Peripheral Stimulation Treatment. **Parkinson's Dis**. v. 39, p. 512. 2015.
- KLEIN, JEFFREY A.; ACKERMAN, S. L. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 6, p. 785-793, 2003.
- ŁACZMAŃSKI, Ł. et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms in Alzheimer's disease patients. **Exp. Gerontol**. v. 69, p. 142-147. 2015.
- LANG, A.E.; LOZANO, A.M. Parkinson's disease. Part 1. **N Engl J Med**, v. 339, p. 1044-1053. 1998.
- 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**, v. 108, p. 69-84. 1996.
- 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**, v. 248, p. 121-8. 2013.
- LANTOS P.L. Cytology of the normal central nervous system. In: Weller R.O. (ed.) *Nervous System, Muscles and Eyes. Systemic Pathology*. **Churchill Livingstone, Edinburgh**. p.3-35. 1990.

LAMBERTUCCI, R. H. Envelhecimento. In: PITHON-CURI. T. C. **Fisiologia do exercício**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

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**, v. 33, n. 7, p.1264–74. 2011.

LEANDRO, C. G. *et al.* Mecanismos adaptativos do sistema imunológico em resposta ao treinamento físico. **RevBras Med Esporte**, v. 13, n. 5. 2007.

LEWIS, M. H. Environmental complexity and central nervous system development and function. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, v. 2, p. 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**, v. 14, p. 478-500. 2009.

LICHTENSTEIN A., FERREIRA-JUNIOR M., SALES M.M., AGUIAR F.B.D., FONSECA L.A.M., SUMITA N.M., DUARTE A.J.S. Vitamin D: Non-skeletal actions and rational use. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p.495-506. 2013.

LINS, Lívia Cristina Rodrigues Ferreira et al., Efeito neuroprotetor do Carvacrol em dois modelos experimentais da Doença de Parkinson: evidências comportamentais e imunohistoquímicas. 2017.

LIN TW, CHEN SJ, HUANG TY, CHANG CY, CHUANG JI, WU FS, KUO YM, JEN CJ: Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance. **Neurobiol Learn Mem**. v.97, p.140-7. 2012.

LITTLEJOHNS, T. J., W. E. HENLEY, I. A. LANG, C. ANNWEILER, O. BEAUCHET, P. H. CHAVES, L. FRIED, B. R. KESTENBAUM, L. H. KULLER, K. M. LANGA, O. L. LOPEZ, K. KOS, M. SONI AND D. J. LLEWELLYN. "Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease." **Neurology**, v. 83, n.10, p. 920-928. 2014.

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**, v. 218, p. 308-14. 2011.

LIU, Y. et al., 2013. Vitamin D: preventive and therapeutic potential in Parkinson's disease. **Curr Drug Metab**, v. 14, n. 9, p. 989-93. 2013.

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

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

LIM, S.A. et al. Enhanced histamine H2 excitation of striatal cholinergic interneurons in L-DOPA-induced dyskinesia. **Neurobiol Dis**, v. 76, p. 67-76. 2015.

LIMA, L.O.S., A. RODRIGUES-DE-PAULA, F. Progressive resistance exercise improves strength and physical performance in people with mild to moderate Parkinson's disease: a systematic review. **J Physiother**, v.59, n. 1, p. 7-13. 2013.

LIMA, L. A. R. Avaliação dos efeitos da suplementação com vitamina D em modelo animal de doença de Parkinson em ratos. 2017. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

LIMA, LUDMILA A R ; LOPES, MARIA JANICE P ; COSTA, ROBERTA O ; LIMA, FRANCISCO ARNALDO V ; NEVES, KELLY ROSE T ; CALOU, IANA B F ; ANDRADE, GEANNE M ; VIANA, GLAUCE S B . Vitamin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and oxidative stress in hemiparkinsonian rats. **Journal of Neuroinflammation**, v. 15, p. 249, 2018.

LEWITT, PETER A.; FAHN, STANLEY. Levodopa therapy for Parkinson disease: a look backward and forward. **Neurology**, v. 86, n. 14, p. 3-12, 2016.

LUCENA, J. D. Efeito neuroprotetor do (-)-linalol em ratos com hemiparkinsonismo experimental induzido por 6-hidroxidopamina. 2019. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

LUCENA, JALLES DANTAS; GADELHA-FILHO, CARLOS VINICIUS JATAÍ; DA COSTA, ROBERTA OLIVEIRA; DE ARAÚJO, DAYANE PESSOA; LIMA, FRANCISCO ARNALDO VIANA; NEVES, KELLY ROSE TAVARES ; DE BARROS VIANA, GLAUCE SOCORRO . L-linalool exerts a neuroprotective action on

hemiparkinsonian rats. **Naunyn-schmiedebergs archives of pharmacology**, v. 1, p. 1-12, 2020.

LV L, TAN X, PENG X, BAI R, XIAO Q, ZOU T, TAN J, ZHANG H, WANG C. The relationships of vitamin D, vitamin D receptor gene polymorphisms, and vitamin D supplementation with Parkinson's disease. **Transl Neurodegener.** v.19, n. 1, p. 34. 2020

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

MAEDA, S. S. *et al.* Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, São Paulo, v. 58, n. 5, p. 411-433, jun. 2014.

MANDEMAKERS W, MORAIS VA, DE STROOPER B. A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. **J Cell Sci.** v.120, p. 1707-16. 2007.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. **Fisiologia do exercício: nutrição, energia e desempenho humano.** 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

MARIES E, DASS B, COLLIER TJ, KORDOWER JH, STEECE-COLLIER K. The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. **Nat Rev Neurosci.** v. 4, n. 9, p. 727-38. 2003.

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

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

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

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

MEADE, R.M., FAIRLIE, D.P. & Mason, J.M. Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease – lessons and emerging principles. ***Mol Neurodegeneration***. v. 14, p. 29. 2019.

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.

MIYAZAKI I, ASANUMA M, HOZUMI H, MIYOSHI K, SOGAWA N. Protective effects of metallothionein against dopamine quinone-induced dopaminergic neurotoxicity. ***FEBS Lett***. v. 581, p. 5003–5008. 2007.

MOHANA DEVI, S. et al. Does retina play a role in Parkinson's Disease? *Acta Neurologica Belgica*, v. 120, n. 2, p. 257–265, 21 abr. 2020.

MOHRI, T. et al. MicroRNA regulates human vitamin D receptor. *Int. J. Cancer.*, v. 125, p. 1328–1333. 2009.

MONTGOMERY D. L. Astrocytes: form, functions and roles in diseases. ***Vet. Pathol.*** v. 31, p. 145-167. 1994.

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***, v. 64, n. 3, p. 314-9. 1998.

MORRIS ME. Locomotor Training in People With Parkinson Disease. *Journal of the American Physical Therapy Association*. v.86, p. 1426-35. 2006.

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

MPANDZOU, G., E. AIT BEN HADDOU, W. REGRAGUI, A. BENOMAR AND M. YAHYAOUUI . "Vitamin D deficiency and its role in neurological conditions: **A review.**" ***Rev Neurol (Paris)***, v. 172, n. 2, p. 109-122. 2016.

MOTHERWELL, M. S.; ZUO, L. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. ***Gene***, v. 532, n. 1, p. 18–23, dez. 92 2013.

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

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.

NEWMARK, Harold L.; NEWMARK, Jonathan. Vitamin D and Parkinson's disease—a hypothesis. **Movement disorders**, v. 22, n. 4, p. 461-468. 2007.

NIRANJAN, R. The Role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of parkinson's disease: Focus on astrocytes. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 28–38. 2014.

NORMAN, A.W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **Am J Clin Nutr**, v. 88, n. 2, p. 491-499. 2008.

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

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

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

OLANOW, C. W.; STERN, M. B.; SETHI, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. **Neurology**, v. 72, n. 21, p. 1-136. 2009.

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

O'LOAN, J., D. W. EYLES, J. KESBY, P. KO, J. J. MCGRATH AND T. H. BURNE. "Vitamin D deficiency during various stages of pregnancy in the rat; its impact on development and behaviour in adult offspring." **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. 3, p. 227-234. 2007.

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

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS – ONU. *Cúpula da ONU discute envelhecimento populacional e desenvolvimento sustentável*. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/cupula-da-onu-discute-envelhecimento-populacional-e-desenvolvimento-sustentavel>>.

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**, v. 328, v. 8, p. 538-45. 1993.

PAHWA, R.; LYONS, K.E. Treatment of early Parkinson's disease. **Movement disorders**, v. 27, p. 4. 2014.

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**, n. 141, p. 569-84. 2006.

PARASKEVAS GP, KAPAKI E, PETROPOULOU O, ANAGNOSTOULI M, VAGENAS V, PAPAGEORGIOU C. Plasma levels of antioxidant vitamins C and E are decreased in vascular parkinsonism. **J Neurol Sci**. v. 215, n 1-2, p. 51-5. 2003.

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**, v.1, n. 16, p. 57-65, 2013.

PRASAD KN, COL WC, KUMAR B. Multiple antioxidants in prevention and treatment of Parkinson's disease. *J Am Coll Nutr*. v. 18, n. 5, p. 413-23. 1999.

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)**, v. 116, n. 10, p.1257-66. 2009.

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

PETERS BSE, MARTINI LA. Funções plenamente reconhecidas de nutrientes: vitamina D. 2. ed. São Paulo: **International Life Sciences Institute do Brasil**; 2014.

PERESE, D. A. *et al.* A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. **Brain Res**, v. 494, n. 2, p. 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**, v. 27, n. 20, p. 5291–300. 2007.

PETERNELLA, F. M. N.; MARCON, S. S. Descobrimos a Doença de Parkinson: impacto para o parkinsoniano e seu familiar. *Revista Brasileira de Enfermagem*, Brasília, v. 62, n. 1, p. 25-31, 2009.

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**, n. 17, n. 5, p. 489–507. 2011.

PETERSON, A.L.M.Z., C.;LEVERENZ, J. B.;WATSON, G. S.;MONTINE, T.;CARNEY, N.;BOWMAN, G. L.;EDWARDS, K.;QUINN, J. F. Memory, mood, and vitamin D in persons with Parkinson's disease. **J Parkinsons Dis**, v. 3, n. 4, p. 547-55. 2013.

PETERSON, A.L. A review of vitamin D and Parkinson's disease. **Maturitas.**, v. 78, p. 40- 4. 2014.

PETZINGER, Giselle 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. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 20, p. 5291-5300. 2007.

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**, v. 136, p. 991-1001, 2005.

PERLMUTTER, J.S.N., S. A. Neuroimaging biomarkers for Parkinson disease: facts and fantasy. **Ann Neurol**, v. 76, n. 6, p.769-83. 2014.

PIGNOLO A, MASTRILLI S, DAVÌ C, ARNAO V, ARIDON P, DOS SANTOS MENDES FA, GAGLIARDO C, D'AMELIO M. Vitamin D and Parkinson's Disease. **Nutrients**. Mar, v. 14, n. 6, p. 1220. 2022.

POULTON, N. P.; MUIR, G. D. Treadmill training ameliorates dopamine loss but not behavioral deficits in hemi-parkinsonian rats. **Experimental neurology**, v. 193, p. 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**, v. 589, p. 2129-38. 2011.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17013, 2017.

PROTTER, David; LANG, Charmaine; COOPER, Antony A.  $\alpha$ Synuclein and mitochondrial dysfunction: a pathogenic partnership in Parkinson's disease?. **Parkinson's disease**, 2012.

QURESHI, I. A., ILYAS, K., YASMIN, R., & WHITTY, M. Challenges of implementing e-learning in a Pakistani university. **Knowledge Management & E-Learning: An International Journal (KM&EL)**, v. 4, n. 3, p. 310-324. 2012.

RACHAKONDA. *et al.* Biomarkers of neurodegenerative disorders: How good are they? **Cell Reserch**, v. 14, n. 5, p. 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)**, v. 79, n. 1, p. 129-35. 1995.

RANG, H.P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Fármacos antibacterianos. *In*:\_\_\_\_\_. **Rang & Dale – Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, cap. 50, p. 633-637. 2015.

REAL, C. C. et al. BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 237, p. 118-29, May 1. ISSN 0306-4522. 2013.

REAL, C. C.; GARCIA, P. C.; BRITTO, L. R. G. Treadmill Exercise Prevents Increase of Neuroinflammation Markers Involved in the Dopaminergic Damage of the 6-OHDA

Parkinson's Disease Model. **J Mol Neurosci**, v. 63, n. 1, p. 36-49, Sep. ISSN 0895-8696. 2017.

REAL, C. C. et al. BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience.*, v. 237, p. 118- 129, May 1 2013.

REAL, C. C. et al. Exercise-induced plasticity of AMPA-type glutamate receptor subunits in the rat brain. *Brain Res.*, v. 1363, p. 63-71, Dec 2 2010.

REAL, C. C. et al. Different protocols of treadmill exercise induce distinct neuroplastic effects in rat brain motor areas. **Brain Res.**, v. 1624, p. 188-198, Oct 22 2015.

RIEDER, C. R. M. et al. Entendendo a doença de parkinson. EdiPUC, Rio Grande do Sul, 2018.

RIEDERER P, BERG D, CASADEI N, CHENG F, CLASSEN J, DRESEL C, JOST W, KRÜGER R, MÜLLER T, REICHMANN H, RIEß O, STORCH A, STROBEL S, VAN EIMEREN T, VÖLKER HU, WINKLER J, WINKLHOFER KF, WÜLLNER U, ZUNKE F, MONORANU CM.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease: causal or bystander? **J Neural Transm (Vienna)**. v.126, n. 7, p. 815-840. Jul. 2019.

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

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

RIEDERER, Peter et al. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. **Journal of neurochemistry**, v. 52, n. 2, p. 515-520. 1989.

RIMMELZWANN, L. M. et el. Systematic Review of the Relationship between Vitamin D and Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 6, n. 0, p. 29-37, Jan. 2016.

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.

RIMMELZWAAN, LISANNE M. et al. 'Systematic Review of the Relationship Between Vitamin D and Parkinson's Disease'. v. 1. p. 9 – 37, Jan .2016.

ROBERGS, R. A.; GHIASVAND, F.; PARKER, D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 287, n. 3, p. 502-16. 2004.

RODRIGUES, M.; CAMPOS, L. C. Tegy for treatment with levodopa in Parkinson's disease. **Revista Analytica**, v. 5, n. 23, p.121–129. 2006.

ROCHA, S., CRISTOVÃO, A., CAMPOS, F., FONSECA, C. & BALTAZAR, G. Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. **Neurobiology of Disease**. In press. 2012.

ROSENSTOCK, T.R.; CARVALHO, A.C.P.; JURKIEWICZ, A.; FRUSSA-FILHO, R.; SMAILI, S.S. Mitochondrial calcium, oxidative stress and apoptosis in a neurodegenerative disease model induced by 3-nitropropionic acid. **J Neurochem** v. 88, p. 1220-1228, 2004.

ROUSSEAU, M. W. *et al.* Progressive dopaminergic cell loss with unilateral-to-bilateral progression in a genetic model of Parkinson disease. **Proc Natl Acad SciUSA**, v. 109, n. 39, p. 15918-23. 2012.

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

SAAVEDRA, Ana; BALTAZAR, Graça; DUARTE, Emília P. Driving GDNF expression: the green and the red traffic lights. **Progress in neurobiology**, v. 86, n. 3, p. 186-215, 2008.

SANCHEZ, B., RELOVA, J.L., GALLEGO, R., BEN-BATALLA, I. AND PEREZ-FERNANDEZ, R.. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 administration to 6-hydroxydopamine-lesioned rats increases glial cell line-derived neurotrophic factor and partially restores tyrosine hydroxylase expression in substantia nigra and striatum. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 3, p. 723-32. 2009.

SARKAR, Souvarish et al. Mitochondrial impairment in microglia amplifies NLRP3 inflammasome proinflammatory signaling in cell culture and animal models of Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 3, n. 1, p. 1-15, 2017.

SAYRE, L.M.; PERRY, G.; SMITH, M. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 21, p. 172-188. 2008.

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.

SEER, C.; LANGE, F.; GEORGIEV, D.; JAHANSHAH, M.; KOPP, B. Event-related potentials and cognition in Parkinson's disease: An integrative review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, Hannover, - Alemanha, v. 71, n. 1, p. 691–714. 2016.

SCHALLERT, Timothy et al. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **neuropharmacology**, v. 39, n. 5, p. 777-78. 2000.

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

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

SLEEMAN, I. et al. the role of vitamin D in disease progressions in early Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's Disease, Newcastle**, v. 7, n. 4, p. 669-675, Set. 2017.

SOMMA, Carolina et al. Vitamin D and neurological diseases: an endocrine view. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 11, p. 2482. 2017.

SOUZA, CFM; ALMEIDA, HCP; SOUSA, JB; COSTA, PH; SILVEIRA, YSS; BEZERRA, JCL. A Doença de Parkinson e o processo de envelhecimento motor: uma revisão de literatura. **Rev Neurosci.** v. 19, v. 4, p. 718-23. 2011.

SOUSA, Caren Nádya Soares de. Efeitos comportamentais e neuroquímicos de ácido alfa- lipóico e desvenlafaxina em modelo animal de depressão induzido por corticosterona / Caren Nádya Soares de Sousa. – 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 95 f. 2015.

SPIVEY, A. Rotenone and paraquat linked to Parkinson's disease: human exposure study supports years of animal studies. *Environ. Health Perspect.* v. 119, n. 6, p. 259. 2011.

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**, v. 50, p. 275-331. 1996.

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

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

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

SCHULZ-KLAUS B. Neurotoxic lesion of the rostral perirhinal cortex blocks stress-induced exploratory behavioral changes in male rats. **Stress**. v.12, n. 2, p. 186-92. 2009.

SCHWARTING RK, CAREY RJ. Differential behavioural effects after subtotal depletions of dopamine or noradrenaline in the ventral striatum. **Funct Neurol.** v. 3, n. 1, p. 29-36. 1988.

SONI, M., K. KOS, I. A. LANG, K. JONES, D. MELZER AND D. J. LLEWELLYN. "Vitamin D and cognitive function." **Scand J Clin Lab Invest Suppl**, n. 243, p. 79-82. 2012.

SOUZA RB, FROTA AF, SOUSA RS, ARA N, MARA L, SOUZA F, et al. Neuroprotective Effects of Sulphated Agar from Marine Alga *Gracilaria cornea* in Rat 6-Hydroxydopamine Parkinson's Disease Model: Behavioural, Neurochemical and Transcriptional Alterations. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** v. 120, p. 159–70. 2017.

SRINIVASAN E, CHANDRASEKHAR G, CHANDRASEKAR P, ANBARASU K, VICKRAM AS, KARUNAKARAN R, RAJASEKARAN R, SRIKUMAR PS. Alpha-Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease. **Front Med (Lausanne)**. V. 18, n 8.

STEFANIS L.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 2, n. 2. 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**, v.15, p. 9-15. 2009.

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

SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 157-169. 2013.

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

SUZUKI, M. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of vitamin D supplementation in Parkinson disease. **Am J Clin Nutr**, v. 97, n. 5, p. 1004-13. 2013.

SARKAR, Souvarish et al. Mitochondrial impairment in microglia amplifies NLRP3 inflammasome proinflammatory signaling in cell culture and animal models of Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 3, n. 1, p. 1-15, 2017.

STEFANIS L.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med.** Feb;2(2):a009399. 2012.

SRINIVASAN E, CHANDRASEKHAR G, CHANDRASEKAR P, ANBARASU K, VICKRAM AS, KARUNAKARAN R, RAJASEKARAN R, SRIKUMAR PS. Alpha-Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease. **Front Med (Lausanne)**. Oct v. 18, n. 8, p. 736-978. 2021.

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**, v. 13, n. 10, p. 200-7, 2010.

TAKAHASHI, H.; WAKABAYASHI, K. The cellular pathology of Parkinson's disease. **Neuropathology**, v. 21, p. 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**, p. 1-11. 2013.

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

TANNER, Caroline M.; GOLDMAN, Samuel M. EPIDEMIOLOGY OF PARKINSON'S DISEASE, **Neurologic Clinics**, v.14, n. 2, p. 317-335. 1996.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 5, p. 803–819, abr. 2013.

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

TILLERSON, J.L.; COHEN, A. D.; PHILHOWER, J.; MILLER, G. W.; ZIGMOND, M. J.; SCHALLERT, T. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 12, p. 4427-4435, 2001.

TILLERSON, Jennifer L. *et al.* Forced nonuse in unilateral parkinsonian rats exacerbates injury. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6790-6799, 2002.

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**, v. 184, p.71-75. 2001.

TOLÖ, J. *et al.* Pathophysiological Consequences of Neuronal  $\alpha$ -Synuclein Overexpression: Impacts on Ion Homeostasis, Stress Signaling, Mitochondrial Integrity, and Electrical Activity. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. March, p. 1–21. 2018.

TOT BABBERICH EDE, N., C. GOURDEAU, S. POINTEL, B. LEMARCHANT, O. BEAUCHET AND C. ANNWEILER. "Biology of subjective cognitive complaint amongst geriatric patients: vitamin D involvement." **Curr Alzheimer Res**, v. 12, n. 2, p. 173-178. 2015.

TOY, W. A. et al. Treadmill exercise reverses dendritic spine loss in direct and indirect striatal medium spiny neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease -. p. 201–209. 2014.

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**, v. 13, p. 365-74. 2002.

TREVISOL-BITTENCOURT PC, TROIANO AR, COLLARES CF. Doença de Parkinson: diagnóstico e tratamento. 2006. [acesso 2022 fev 15]. Disponível em; [URL:http://www.neurologia.ufsc.br/artigos/parkinsonismo/doenca.html](http://www.neurologia.ufsc.br/artigos/parkinsonismo/doenca.html)

TRIMMER PA, BENNETT JP: The cybrid model of sporadic Parkinson's disease. **Exp Neurol**. 2009.

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**, v. 475, p. 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**, v. 227, p. 305-312. 2012.

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

TUON, Talita et al. Physical training regulates mitochondrial parameters and neuroinflammatory mechanisms in an experimental model of Parkinson's disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2015.

TURNER, K. M., J. W. YOUNG, J. J. MCGRATH, D. W. EYLES AND T. H. BURNE. "Cognitive performance and response inhibition in developmentally vitamin D (DVD)deficient rats." **Behav Brain Res.** v. 242, p. 47-53. 2013.

TYSNES, O. B., STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, n. 124, n. 8, p. 901-905. 2017.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol**, v. 5, v. 1, p. 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**, v. 24, p. 485-493. 1970.

VAN DEN BOS, F. et al., 2013. Parkinson's disease and osteoporosis. **Age Ageing**, v. 42, n. 2, p. 156-62. 2013.

VAN DEN EEDEN, S.K., TANNER, C.M., BERNSTEIN, A.L., et al., Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. **American Journal of Epidemiology**, v. 157, p. 1015-1022. 2003.

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

VALKO, Marian et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84. 2007.

VILLANUEVA, C.; KROSS, R. D. Antioxidant-Induced Stress. **Int J Mol Sci**, v. 13, p. 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**, v. 29, p. 230-4. 2009.

VILLEGAS PEDRAZA, N. L. et al. Análisis funcional de oligómeros de alfasinucleína en la permeabilidad de membranas. **Acta bioquím. clín. Latinoam**, v. 48, n. 4, p. 437–445. 2014.

VISSERS, Dirk et al. The effect of exercise on visceral adipose tissue in overweight adults: a systematic review and meta-analysis. **PloS one**. v. 8, n. 2, p. 56415. 2013.

VIRMANI, A.; PINTO, L.; BINIENDA, Z.; ALI, S. Food, nutrigenomics and neurodegeneration-neuroprotection by what you eat!!! **Mol Neurobiol** v. 48, p. 353-362. 2013.

WALUSINSKI, O. Jean-Martin Charcot and Parkinson's disease: Teaching and teaching materials. **Revue Neurologique**, v. 174, n. 7–8, p. 491–505, 2018.

WANG, Shaoxia et al. Tanshinone I selectively suppresses pro-inflammatory genes expression in activated microglia and prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. **Journal of ethnopharmacology**, v. 164, p. 247-255. 2015

WANG, J.Y. et al. Vitamin D(3) attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. **Brain Res**, v. 904, n. 1, p. 67-75. 2001.

WANG, L.; EVATT, M.L.; MALDONADO, L.G.; PERRY, W.R.; RITCHIE, J.C.; BEECHAM, G.W., et al. Vitamin D from different sources is inversely associated with Parkinson disease. **Mov. Disord.**, v. 30, n. 4, p. 560–6. 2015..

WEINTRAUB, D.; COMELLA, C. L.; HORN, S. Parkinson's disease – Part III: Neuropsychiatric symptoms. **Am J Manag Care**, v. 14, p. 59-69. 2008.

WIETZIKOSKI, E. C. **Estudo comparativo do comportamento ipsiversivo e contraversivo 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.

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**, v. 25, n. 1, p. 135-46. 2011.

WRZOSEK, M. et al. Vitamin D and the central nervous system. **Pharmacol Rep**. V. 65, n. 2, p. 271-8. 2013.

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

XU L, PU J. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. **Parkinsons Dis.** v. 17, p. 206.2016.

XY. Luo, R. Ou, HF. Shang. Association between serum Vitamin D levels and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis [abstract]. **Mov Disord.** v. 33, n. 2. 2018.

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

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

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**, v. 13, n. 84, p. 69-79. 2011.

ZHANG Y, JI W, ZHANG S, GAO N, XU T, WANG X, ZHANG M. Vitamin D Inhibits the Early Aggregation of  $\alpha$ -Synuclein and Modulates Exocytosis Revealed by Electrochemical Measurements. **Angew Chem Int Ed Engl.** Jan 3;61(1), 2022.

ZENG, X. S.; GENG, W. S.; JIA, J. J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN Neuro**, v. 10, 2018.

ZHANG Y, JI W, ZHANG S, GAO N, XU T, WANG X, ZHANG M. Vitamin D Inhibits the Early Aggregation of  $\alpha$ -Synuclein and Modulates Exocytosis Revealed by Electrochemical Measurements. **Angew Chem Int Ed Engl.** v. 3, p. 61-1, Jan. 2022.