

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TALITA TUON

**EFEITOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE EXERCÍCIO
FÍSICO SOBRE A NEURORREGULAÇÃO DE PARÂMETROS
DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL, INFLAMAÇÃO E ESTRESSE
OXIDATIVO CEREBRAL EM UM MODELO EXPERIMENTAL
DE DOENÇA DE PARKINSON**

CRICIÚMA, SETEMBRO DE 2014



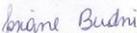
UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

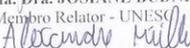
PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Talita Tuon** sob o título “Efeitos de diferentes protocolos de exercício físico sobre a neuroregulação de parâmetros da função mitocondrial, inflamação e estresse oxidativo cerebral em um modelo experimental de Doença de Parkinson” para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

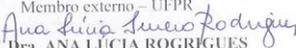
Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito A.

Criciúma, SC, 30 de setembro de 2014.


Profa. Dra. JOSIANE BUDNE
Membro Relator - UNESC


Prof. Dr. ALEXANDRE PASTORIS MULLER
Membro interno - UNESC


Prof. Dr. ELKE BROMBERG
Membro externo - UFPR


Prof. Dra. ANA LÚCIA RODRIGUES
Membro externo - UFSC


Prof. Dr. RICARDO FIALHO
Orientador


Prof. Dr. Cláudio Fedeiro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício e Laboratório de Neurociências do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico este trabalho aos meus pais, Cecília e Valdir “In Memoriam”, que em momentos difíceis me fizeram seguir em busca dos meus objetivos e são meus maiores exemplos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus;

Agradeço à minha família, meus pais Cecília e Valdir “In Memoriam” que sempre me mostraram o melhor caminho a seguir, e meu irmão Vítor, pelos momentos de descontração e apoio;

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

Agradeço a Samira, Gislaine, Priscila, Camila, Luciano, Thaís, Fabrícia, Josiane, Franciane, Scherolin e Hemelin pela amizade e ajuda no decorrer da minha trajetória;

Agradeço aos alunos de iniciação científica que permanecem no Lafibe e também os que já passaram pelo mesmo. Bruna, Carla, Giovanna, Giulia, Fernando, Paula, Matheus, Marcela, Tamara e Fernanda, pela colaboração neste trabalho;

Agradeço todos meus amigos que me ajudaram indiretamente para que eu chegasse até aqui;

Agradeço aos professores Cláudio da Cunha, Cláudio Teodoro de Souza e Rafael Dutra, os quais nos proporcionaram aprendizado e parcerias para a realização deste trabalho;

Agradeço aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pelos ensinamentos;

Agradeço ao meu orientador Ricardo Aurino Pinho, pela confiança, pelo meu crescimento pessoal e intelectual, pelas conversas, conselhos, amizade e principalmente pela orientação;

Agradeço aos funcionários do PPGCS e do Biotério da UNESC;

Meu muito obrigada a todos!!!

...Nada aqui é certo
O que é certo mesmo, é que temos que viver
Cada momento
Cada segundo
Amando, sorrindo, chorando, emocionando, pensando, agindo,
querendo, conseguindo
E só assim
É possível chegar àquele momento do dia
Em que a gente diz:
"Graças a Deus deu tudo certo" ...
(Luís Fernando Veríssimo)

RESUMO

O objetivo desse estudo foi analisar os efeitos de diferentes protocolos de exercício físico sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em um modelo experimental de doença de Parkinson (DP), induzido por 6-OHDA. No primeiro experimento os ratos foram randomicamente divididos em 4 grupos (n=8): Sham, DP, TR (sham + treinado), e TR+DP (treinado + DP) e nos dois experimentos seguintes em 6 grupos (n=12): Sham, TF (treinamento de força), TE (treinamento de esteira), DP, TF + DP e TE + DP. O treinamento físico foi realizado durante 8 semanas e a DP foi induzida pela administração de 6-OHDA 24 horas após a última sessão de exercício. Sete dias após a lesão, os animais foram submetidos a testes comportamentais (teste rotacional, campo aberto e nado forçado) sofreram eutanásia por decapitação. O estriado e o hipocampo foram cirurgicamente removidos e processados em tampão específico para análise por Wester blot da tirosina-hidroxilase (TH), fator neutrófico derivado do encéfalo (BDNF), α -sinucleína, retículo sarcoplasmático Ca^{2+} -ATPase (SERCA II), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), fator neutrófico derivado do encéfalo imaturo (pró-BDNF), receptores tirosina quinase (TrkB), fator nuclear kappa B (NF-kB) e Sirtuina 1 (Sirt1) ou para o dano oxidativos em lipídeos (TBARS) e proteínas (grupos carbonilas). Níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-17, INF- γ e TGF- β 1), atividade do complexo I e produção de NO (nitrato/nitrito) também foram mensurados. No primeiro estudo, os grupos DP e TR+DP mostraram uma assimetria rotacional e uma redução significativa do nível de TH, BDNF, α -sinucleína, SOD, CAT, e GPX, bem como um aumento no conteúdo de TBARS e grupos carbonilas, tal como observado no grupo DP. O nível TH não foi significativamente alterado, mas o grupo TR+DP elevou os níveis de BDNF, SERCA II, SOD e CAT e diminuiu o dano oxidativo em lipídeos e proteínas. No segundo estudo, os animais com DP apresentaram uma alteração no comportamento tipo depressivo e assimetria rotacional, e quando submetidos aos treinamentos de esteira e força, estes parâmetros foram diminuídos além de aumentar os níveis de pró-BDNF, BDNF e TrkB, no estriado e hipocampo de camundongos. Adicionalmente, uma melhora significativa na atividade do complexo I, SIRT-1 e níveis de TH foram observados nos animais expostos aos diferentes modelos de treinamento físico, bem como, uma redução nos níveis de NF-kB e TNF- α , IL-1 β , IL-17, INF- γ e TGF- β 1 no estriado e hipocampo de camundongos após a administração de 6-

OHDA. Tomados em conjunto, os resultados obtidos sugerem que o treinamento físico, independente dos modelos utilizados, mas sob as condições de intensidade, volume e duração estabelecidos nesse estudo, exerce um efeito neuroprotetor no hipocampo e estriado de roedores expostos a um modelo experimental de DP. Possivelmente esses resultados, decorrem da capacidade que o treinamento físico demonstrou em modular o estado redox cerebral e preservar o conteúdo de proteínas neurotróficas com conseqüente modulação dos parâmetros inflamatórios, as quais são importantes para a manutenção da função cerebral normal.

Palavras-chave: estresse oxidativo; função mitocondrial; inflamação; exercício físico; 6-hidroxidopamina e Doença de Parkinson.

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the effects of different protocols of physical exercise on behavioral and neurochemical parameters in an experimental model of Parkinson's disease (PD) induced by 6-OHDA. In the first study the animals were randomly divided into four groups (n = 8): Sham, DP, TR (sham + trained) and DP + TR (trained + SD) and the two following studies in six groups (n = 12) : Sham, ST (strength training), TT (treadmill training), DP, ST + PD and TR + PD. Physical training was carried out for 8 weeks and 24 hours after the last exercise session the PD was induced by the administration of 6-OHDA. Seven days after the exposure to 6-OHDA, the animals performed behavioral tests (rotational test, open field and forced swim tests) and euthanized by decapitation. The striatum and hippocampus were surgically removed and processed in a specific buffer for analysis by West Blot of tyrosine hydroxylase (TH), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), α -synuclein, sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} + ATPase (SERCA II), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), pro-brain-derived neurotrophic factor (pro-BDNF), tyrosine kinase B (TrkB) receptors, nuclear factor kappa B (NF- κ B) and 1 - Sirtuin (Sirt1) or to the oxidative damage in lipids (TBARS) and proteins (carbonyl groups). Levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-17, INF- γ and TGF- β 1), complex I activity NO production (nitrite / nitrate) were also measured. In the first study, PD and TPD groups showed a rotational asymmetry and a significant decrease in the level of TH, BDNF, alpha-synuclein, SOD, CAT, and GPX, as well as an increased content of TBARS and carbonyl, as seen in PD group. The TH level was not significantly changed, but the TPD group showed raised levels of BDNF, SERCA II, SOD and CAT and decreased oxidative damage to lipids and proteins. In the second study, animals with PD showed a change in depressive behavior and rotational asymmetry, and when exposed to treadmill and strength training these parameters were decreased, furthermore the levels of pro-BDNF, BDNF and TrkB in striatum and hippocampus of mice were increased. Additionally, a significant improvement in the complex I, SIRT-1 and TH activity levels were observed in animals exposed to different models of physical training as well as a reduced levels of NF- κ B and TNF- α , IL-1 β , IL 17, INF- γ and TGF- β in the striatum and hippocampus of mice after the administration of 6-OHDA. Taken together, the results suggest that physical training, regardless of the models used, but under the conditions of intensity, volume and duration used in this study, exerts a

neuroprotective effect in hippocampus and striatum of rodents exposed to an experimental model of PD. These results reflect the ability of physical training to modulate the redox state of brain and preserve the content of neurotrophic protein with modulation of inflammatory parameters, which are important for the maintenance of normal brain function.

Keywords: oxidative stress; mitochondrial function; inflammation; exercise; 6-hydroxydopamine and Parkinson's disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da via nigroestriatal	36
Figura 2: Representação da síntese de DA e NA	39
Figura 3: Mecanismos de neurotoxicidade induzido por 6-OHDA	50
Figura 4: Representação do camundongo com lesão na SNpc por 6-OHDA	51
Figura 5: Desenho experimental do primeiro experimento.....	53
Figura 6: Desenho experimental do segundo e terceiro experimento ..	53
Figura 7: Efeitos do treinamento físico sobre valores do teste de rotarômetro em animais expostos a 6-OHDA.	61
Figura 8: Efeitos do treinamento físico sobre a atividade e expressão da TH, BDNF, α -sinucleína e SERCAII, no estriado de animais expostos a 6-OHDA.....	63
Figura 9: Efeitos do treinamento físico sobre a atividade do TBARS e grupos carbonilas, no estriado de animais expostos a 6-OHDA	64
Figura 10: Efeitos do treinamento físico sobre a atividade da SOD, CAT e GPX, no estriado de animais expostos a 6-OHDA.....	65
Figura 11: Efeitos de dois protocolos de treinamento físico no teste do rotarômetro, nado forçado e atividade locomotora no campo aberto em animais expostos a 6-OHDA.....	66
Figura 12: Efeitos de dois protocolos de treinamento físico sobre os níveis de pró-BDNF, BDNF e TrkB, no estriado e hipocampo de animais expostos a 6-OHDA.....	68
Figura 13: Efeitos de dois protocolos de treinamento físico sobre os níveis de TH no estriado e hipocampo de animais expostos a 6-OHDA.	69
Figura 14. Efeitos de dois protocolos de treinamento físico sobre os níveis de SIRT-1 e Complexo I no estriado e hipocampo de animais expostos a 6-OHDA	70
Figura 15. Efeitos de dois protocolos de treinamento físico sobre os níveis de TNF- α , NF- κ B e IFN- γ no estriado e hipocampo de animais expostos 6-OHDA.....	72

Figura 16. Efeitos de dois protocolos de treinamento físico sobre os níveis de IL-17, IL-1 β , TGF- β 1 e NO no estriado e hipocampo de animais expostos a 6-OHDA.....74

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- ABP - Associação Brasileira de Parkinson
ATP - Trifosfato de adenosina (do inglês *Adenosine triphosphate*)
BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo (do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*)
BH4 - Tetra-hidrobiopterina
BSA - Albumina de soro bovino (do inglês *Bovine serum albumin*)
CoQ1 - Coenzima Q1 redutase
COX-2 - Ciclo-oxigenase-2
DA - Dopamina
DAT - Transportador de dopamina (do inglês *Dopamine transporter*)
DNA - Ácido Desoxirribonucléico, (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)
DOPAC - Ácido dihidroxifenilacético, (do inglês *Dihydroxyphenylacetic acid*)
DP - Doença de Parkinson
DTNB - 5', 5''-ditiobis-(2-nitrobenzoato)
ERN - Espécies reativas de nitrogênio
ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
GDNF - Fator neurotrófico derivado de células gliais, (do inglês *Glial cell line-derived neurotrophic factor*)
GSH - Glutathiona reduzida
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ - Interferon-gama
IL-17 - Interleucina-17
IL-1 β - Interleucina-1 beta
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível, (do inglês *Inducible nitric oxide synthase*)
MAO - Monoamino oxidase
MHC - Complexo maior de histocompatibilidade, (do inglês *Major histocompatibility complex*)
MPO - Mieloperoxidase
MPP⁺ - 1-Metil-4-fenilpiridina, (do inglês *1-methyl-4-phenylpyridinium*)
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina, (do inglês *1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*)
NA - Noradrenalina
NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NF- κ B - Fator nuclear KB, (do inglês *Nuclear Factor kappa B*)

PBS - Tampão fosfato-salina, (do inglês *Phosphate buffered saline*)
PGC1- α - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama coativador 1-alfa, (do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)
pH - Potencial hidrogeniônico
PPAR γ - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama, (do inglês *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)
RL - Radicais livres
Serca II - Retículo endoplasmático Ca²⁺ - ATPase, (do inglês *Endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*)
SIRT-1 - sirtuína 1
SNA- Sistema nervoso autônomo
SNC - Sistema nervoso central
SNpc - Substância nigra parte compacta
TGF- β 1 - Fator de transformação de crescimento-1 beta, (do inglês *Transforming growth factor beta 1*)
TH - Tirosina hidroxilase
TNB – Ácido 2-nitro-5-tiobenzóico
TNF- α - Fator de necrose tumoral-alfa, do inglês *Tumor necrosis factor alpha*
TRkb - Tirosina quinase, (do inglês *Tyrosine kinase*)
5-HT – Receptor 5-hidroxitriptamina
6 OHDA – 6 Hidroxidopamina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	35
1.1	DOENÇA DE PARKINSON	35
1.2	NEUROFISIOLOGIA	37
1.3	ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA.....	40
1.4	DEPRESSÃO NA DOENÇA DE PARKINSON.....	41
1.5	DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E A DOENÇA DE PARKINSON.....	42
1.6	ESTRESSE OXIDATIVO E A DOENÇA DE PARKINSON	43
1.7	NEUROINFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE PARKINSON	45
1.8	EXERCÍCIO FÍSICO NA DOENÇA DE PARKINSON.....	47
1.9	MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-OHDA.....	48
2	OBJETIVOS	52
2.1	GERAL	52
2.2	ESPECÍFICOS	52
3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	53
3.2	EXPERIMENTO1.....	53
3.2.1	Amostras	53
3.2.2	Protocolo de treinamento.....	54
3.2.3	Procedimentos cirúrgicos.....	54
3.3	EXPERIMENTO 2 E 3	55
3.2.1	Amostras	55
3.3.2	Protocolo de treinamento.....	55
3.3.3	Procedimentos cirúrgicos.....	55
3.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	56

3.4.1	Teste do rotarômetro	56
3.4.2	Testes de campo aberto.....	56
3.4.3	Teste do nado forçado	57
3.5	PROCEDIMENTOS DE EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDO	57
3.6	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	57
3.6.1	Análises de proteínas por western blot.....	57
3.6.2	Marcadores de danos oxidativos.....	58
3.6.3	Determinação dos níveis de citocinas.....	58
3.6.4	Determinação da atividade enzimática do complexo I.....	59
3.6.5	Determinação de nitrato/nitrito (NOx).....	59
3.6.6	Determinação de proteínas totais.....	59
3.7	ANÁLISE ESTÁSTICA	60
4	RESULTADOS	61
4.1	EXPERIMENTO 1.....	61
4.1.1	Teste de rotarômetro.....	61
4.1.2	Níveis de TH, BDNF, α -sinucleína e SERCA II.....	62
4.1.3	Danos oxidativos.....	63
4.1.4	Enzimas antioxidantes	64
4.2	EXPERIMENTO 2 E 3	65
4.2.1	Testes comportamentais.....	65
4.2.2	Níveis de pró-BDNF, BDNF e TrkB	67
4.2.3	Níveis de TH.....	69
4.2.4	Níveis de SIRT-1 e Complexo I	69
4.2.5	Níveis de TNF- α , NF-kB e IFN- γ	70
4.2.6	Níveis de IL-17, IL-1 β , TGF- β 1 e NO	73
5	DISCUSSÃO.....	75
5.1	Treinamento físico exerce efeitos neuroprotetores na regulação de fatores neuroquímicos sobre a DP.....	75

5.2 Treinamento físico previne comportamento tipo depressivos e diminui o fator neurotrófico derivado do cérebro em animais submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA	78
5.3 Treinamento físico regula parâmetros da função mitocondrial e mecanismo de neuroinflamação em animais submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA.....	81
6 CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXO	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva lenta e irreversível, com prevalência estimada em 1 a 3 % na população mundial com idade acima de 55 anos (Emborg, 2004; Gandhi e Wood, 2005; Protter et al., 2012). É a segunda doença degenerativa mais prevalente no mundo após a doença de Alzheimer (Olanow e Tatton, 1999; Fahn e Sulzer, 2004; Lau e Breteler, 2006).

Em 1817, a doença foi descrita pela primeira vez, como uma síndrome neurológica, pelo médico inglês James Parkinson, que publicou “*An Essay on the Shaking Palsy*” (Ensaio sobre a paralisia agitante) (Dauer e Przedborski, 2003; Trimmer et al., 2009), no qual descreveu as características clínicas de seis pessoas. Os sinais clínicos característicos observados foram tremor em repouso, rigidez do tônus muscular, acinesia, bradicinesia e distúrbios do reflexo postural, com instabilidades posturais (Tajiri et al., 2010). Anos mais tarde, no século XX, o neurologista francês Jean Charcot, descreveu melhor a DP, graças aos seus estudos e aos conhecimentos clínicos da doença. Além dos sintomas motores, os pacientes afetados pela DP também podem manifestar sintomas não motores, antecedem os sintomas motores, como alteração cognitiva, da memória, do sistema nervoso autônomo (SNA), alterações do sono e depressão (Fotiou et al., 2009; Sevillano-García e Manso-Calderón, 2010). Em alguns casos, a sintomatologia da doença pode existir de maneira unilateral, com início nas primeiras fases da doença, podendo predominar e perdurar por muito tempo no seu transcorrer, chegando até a 20 ou 30 anos, após o diagnóstico (Qureshi et al., 2012). A principal característica neuropatológica da DP é a perda de neurônios dopaminérgicos, localizados na substância nigra do mesencéfalo e por inclusões intracitoplasmáticas destes neurônios conhecidos como corpos ou corpúsculos de Lewy, a partir da agregação anormal de proteínas como α -sinucleína e ubiquitina (Emborg et al., 2004; Gandhi e Wood, 2005; Protter et al., 2012). Na DP a via nigroestriatal está atribuída ao déficit na quantidade de dopamina (DA) no cérebro (Gandhi e Wood, 2005), sendo constituída por neurônios, associado a corpos celulares localizados na substância nigra parte compacta (SNpc) e projetam seus axônios para o caudado-putâmen, ou corpo do estriado (Rousseaux et al., 2012) (Figura 1). Estes neurônios têm como função a produção de DA, como neurotransmissor, a qual exerce uma função inibidora importante no controle central dos

movimentos (Yamanouchi e Nagura, 1997; Dauer e Przedorski, 2003). O comprometimento desse processo altera os movimentos automáticos, assim como a regulação do tônus e da postura (Dauer e Przedorski, 2003; Gandhi e Wood, 2005; Da Cunha et al., 2008).

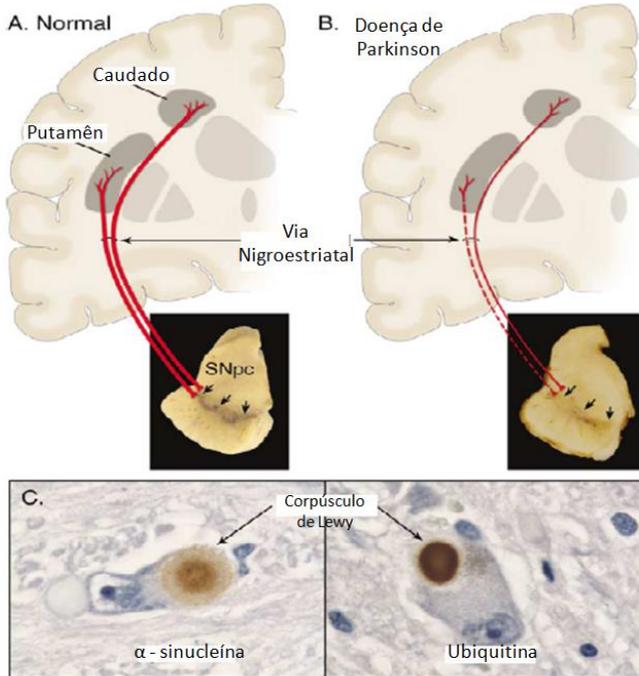


Figura 1 - Representação da via nigroestriatal, paciente saudável (A) e paciente com a doença de Parkinson (B). (C) Representações das inclusões citoplasmáticas (corpúsculos de Lewy) (Adaptação conforme Dauer e Przedorski, 2003).

Adicionalmente, a diminuição de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal conduz para uma grande perda nos níveis de DA no estriado (Dauer e Przedorski, 2003; Da Cunha et al., 2008), gerando o aparecimento sintomático característico da DP. Análises bioquímicas demonstram que os sintomas manifestam-se quando há uma diminuição substancial de DA, em torno de 50% ou mais (Debeir et al., 2005; Haleagrahara et al., 2011).

1.2 NEUROFISIOLOGIA

O comprometimento do sistema extrapiramidal altera os movimentos automáticos, assim como a regulação do tônus e da postura e em consequência há presença de movimentos involuntários, espontâneos e com alterações no tônus observado através de distúrbios clínicos como tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (Arruda e Menezes, 2003). Estudos clínicos iniciais de um distúrbio motor, originalmente denominado “paralisia trêmula” por James Parkinson em 1817, foram relacionados à degeneração de neurônios em uma região dos gânglios basais denominada substância nigra pars compacta (SNpc). Alterações desse núcleo estão associadas aos sintomas motores complexos, caracterizados por lentidão ou falta de movimento (Rousseaux et al., 2012).

Alterações celulares em outras regiões dos gânglios basais resultam em sintomas motores muito diferentes, como os movimentos descontrolados da doença de Huntington (Olanow e Tatton, 1999; Arruda e Menezes, 2003).

Os gânglios da base consistem em cinco núcleos subcorticais que se estendem ao telencéfalo, ao diencéfalo e ao mesencéfalo. Diferentes terminologias têm sido utilizadas para o grupo de núcleos que constituem os gânglios basais, mas, comumente eles têm sido descritos como núcleo caudado, putâmem, globo pálido, núcleo subtalâmico e substância nigra (Rousseaux et al., 2012).

A substância nigra é constituída por uma camada grande de células situadas dorsalmente ao pedúnculo cerebral. Ela também é composta por dois grupos celulares. A parte compacta é a mais dorsal das duas e apresenta a maioria das células que produzem o neurotransmissor DA. Uma substância pigmentada denominada melanina, a qual é derivada da DA, faz com que o tecido tenha um aspecto escuro e é responsável pelo nome “substância nigra”. A parte reticulada é pálida e juntamente ao globo pálido interno forma a principal via de saída de informação dos gânglios da base. Funcionalmente, esses dois núcleos podem ser considerados uma estrutura conhecida como núcleos de saída (Dauer e Przedborski, 2003; Trimmer et al., 2009; Rousseaux et al., 2012).

A DA possui diversos efeitos mediados por subfamílias de receptores dopaminérgicos, principalmente, D1 e D2. A distribuição neuroanatômica de cada tipo de receptor dopaminérgico é variável, o que sugere funções específicas para cada um deles. A questão fisiológica crítica nos diferentes modelos de funcionamento dos

gânglios da base fundamenta-se no aspecto da segregação ou co-localização dos receptores D1 e D2 (Dauer e Przedborski, 2003). Se os receptores são segregados, a DA pode, diferencialmente, regular as vias diretas e indiretas pela estimulação concomitante dos respectivos receptores D1 e D2. Os receptores do tipo D1 são geralmente encontrados em regiões pós-sinápticas. Os receptores D2 são responsáveis por desempenhar um papel importante na codificação da função motora no estriado, sendo encontrados em regiões pós-sinápticas e pré-sinápticas (Dauer e Przedborski, 2003; Caiazzo, 2011). Existem várias evidências que suportam a idéia segregativa de receptores, mas o mecanismo de ação a nível celular desses receptores mostra um processo complexo, incluindo o envolvimento de outros neurotransmissores (Arruda e Meneses, 2003; Trimmer et al., 2009; Rousseaux et al., 2012). A síntese de DA consiste na conversão do aminoácido tirosina em L-DOPA pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH), na presença do cofator obrigatório tetrahydrobiopterina (BH4), seguida da ação da descarboxilase de aminoácidos aromáticos para posteriormente ser convertida a DA e armazenada em vesículas sinápticas (Fahn e Sulzer, 2004; Trimmer et al., 2009; Rousseaux et al., 2012).

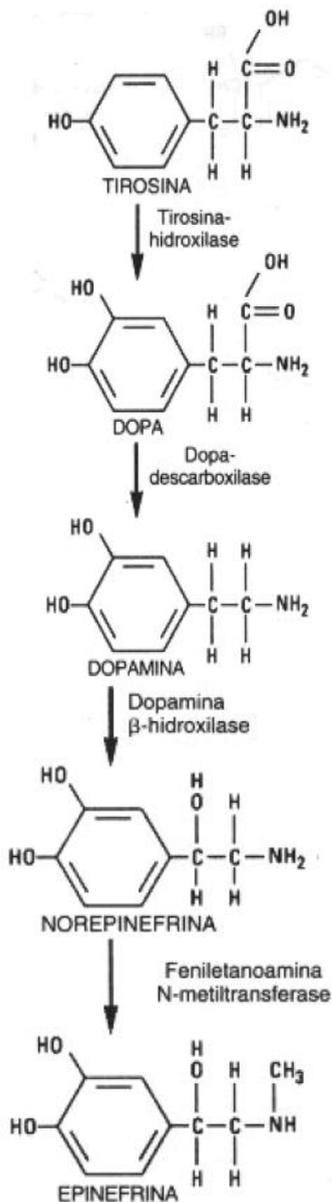


Figura 2 - Representação da síntese de dopamina e noradrenalina. Fonte: <http://www.hu.uel.br/index.php?pagina=129&pai=5>

1.3 ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

Segundo dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2011, a proporção de idosos no Brasil teve um crescimento generalizado nos últimos dez anos. O percentual de pessoas com mais de 60 anos aumentou de 8,6%, em 2000, para 10,8% em 2010. Representando aproximadamente 15 milhões de habitantes e nos próximos 20 anos, o número de idosos no Brasil poderá ultrapassar a marca dos 30 milhões e deverá representar quase 13% da população ao final deste período. O aumento do número de pessoas com mais de 60 anos vai refletir também o crescimento da quantidade de idosos com a DP, uma vez que a idade está diretamente relacionada com as doenças neurodegenerativas, em especial Parkinson e Alzheimer (Protter et al., 2012).

A DP atinge todos os grupos étnicos independentemente de classes sócio-econômicas. Segundo o Ministério da Saúde de 2011, estima-se uma prevalência mundial de 100 a 200 casos por 100.000 habitantes. Embora a prevalência da DP no Brasil não seja conhecida, dados da Associação Brasileira de Parkinson (ABP) (2011), indicam que no país aproximadamente 2% da população brasileira são acometidos pela doença.

Embora a etiologia da DP ainda permaneça pouco compreendida, muitos fatores têm sido associados à predisposição e à manifestação da doença. A redução dos neurônios dopaminérgicos pode estar associada a diferentes mecanismos, incluindo estresse oxidativo, excitotoxicidade, distúrbio homeostático do cálcio, inflamação, fatores genéticos, apoptose, fatores ambientais e agregação de proteínas (Dauer e Przedborski, 2003; Emborg et al., 2004; Varçin et al., 2012). Outra possibilidade para a causa da doença está relacionada ao fator genético. Genes como *parkina*, podem estar envolvidos com o aparecimento da doença (Protter et al., 2012).

Alguns estudos têm destacado o papel de fatores ambientais no desenvolvimento da DP, como por exemplo, a exposição crônica à alguns tipos de herbicidas e pesticidas (Fall et al., 1999; Vanacore et al., 2002). A rotenona e paraquate são exemplos de pesticidas e herbicidas, os quais possuem penetração livre através da membrana celular em neurônios dopaminérgicos, inibindo o Complexo I, da cadeia respiratória, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO). Sua principal ação é o desacoplamento da fosforilação oxidativa e também o colapso do potencial da membrana mitocondrial, resultando na redução das

concentrações de Adenosina trifosfato (ATP), induzindo a apoptose celular (Veech et al., 2000; Esteves et al., 2008).

Embora, o processo neurodegenerativo da DP não esteja totalmente esclarecido, muitos estudos sugerem que a doença seja desencadeada por um ou mais fatores, como produção excessiva de radicais livres (RL), toxinas ambientais, envelhecimento cerebral, disfunção mitocondrial, predisposição genética e neuroinflamação (Olanow et al., 1998; Alexi et al., 2000; Peng et al., 2005; Lau e Breteler, 2006; Abdin e Sarhan, 2011). Outro mecanismo fisiopatológico na DP parece ser a depleção nos níveis de DA na SNpc, não diretamente relacionada à perda dos neurônios da via nigroestriatal, mas a associada com a degeneração da própria via nigroestriatal dependente dos corpúsculos de Lewy, os quais são marcadores patológicos da DP (Yoon et al., 2007; Tajiri et al., 2010). Estudos mostram que a degeneração na via nigroestriatal esta associada com a diminuição de DA em regiões do cérebro como córtex pré-frontal, as quais recebem projeções dopaminérgicas da área tegmental ventral (Yoon et al., 2007; Tajiri et al., 2010).

1.4 DEPRESSÃO NA DOENÇA DE PARKINSON

A depressão tem sido apontada como um dos fatores responsáveis para uma redução na qualidade de vida dos pacientes, assim como, na piora das funções cognitivas e motoras na DP, tendo um grande impacto no prognóstico da doença (Kish, 2003; Rojo et al., 2003; Weintraub, 2011). Sua prevalência em pacientes com a DP ocorre em torno de 25% a 40%, incluindo estágios iniciais e finais da doença (Silberman et al., 2004; Poewe et al., 2007).

Além da neurodegeneração e perda de transmissão dopaminérgica, outros sistemas de neurotransmissores estão significativamente prejudicados na DP, incluindo sistemas de transmissão noradrenérgicos e serotoninérgicos (Chan-palay e Asan, 1989; Kish, 2003). Juntamente com a perda severa de neurônios dopaminérgicos, e os danos a sistemas glutamatérgicos contribuem para a depressão e déficits cognitivos, que são observadas em mais de 50% dos pacientes com DP (Ravina et al., 2007; Martínez- Martín e Damián, 2010; Goldman e Litvan, 2011; Smith et al., 2012). Efeitos inibitórios locais garantem o retorno da homeostase, porém, um estressor pode romper este sistema de feedback, alterando os níveis estriatais e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), responsável pelo

crescimento e diferenciação de novos neurônios e suas conexões (Aan Het Rot et al., 2009).

A depressão na DP também pode ser resultado de um estágio avançado da doença degenerativa, associado a uma disfunção entre o sistema catecolaminérgico (dopamina e noradrenalina) e serotoninérgico, sendo um indicativo de um quadro avançado da depressão (Goldman e Litvan, 2011; Smith et al., 2012). Estudos mostram que a baixa atividade serotoninérgica, pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da DP (Kish, 2003; Goldman e Litvan, 2011). A serotonina tem como função, inibição da liberação de DA no estriado, sendo assim, a redução da atividade da serotonina pode ser um mecanismo compensador para a redução da atividade de DA na DP. Contudo, a redução de serotonina pode levar a um quadro depressivo, predispondo também a maior vulnerabilidade dos pacientes com DP sofrerem um transtorno depressivo. Embora complexa, a depressão e a DP, são transtornos que apresentam fatores de risco interferindo para o desenvolvimento de ambas (Kish, 2003).

O tratamento farmacológico da DP é complexo, e os pacientes são tratados, com o objetivo principal de controlar os sintomas (Worth, 2013). A levodopa, a qual é convertida em DA no cérebro, é o fármaco mais eficaz na DP reduzindo o tremor, rigidez e lentidão, e melhorando o controle muscular, equilíbrio e marcha. No entanto, não é possível parar a degeneração subjacente, apenas com o tratamento, amenizar os sintomas que são resultados de danos aos neurônios também não-dopaminérgicos (Minagar et al., 1999; Coelho e Ferreira, 2012; Hirsch, 2012; Starkstein et al., 2012).

1.5 DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E A DOENÇA DE PARKINSON

Nos últimos anos, vários estudos experimentais e revisões têm sido realizados mostrando o papel da disfunção mitocondrial na DP (Fischer et al., 1985; Fornai et al., 2005; Keeny et al., 2006; Schapira et al., 2006; Aguiar et al., 2008; Kerr et al., 2010; Winklhofer e Haass, 2010) e essas alterações parecem refletir na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), contribuindo para a senescência cerebral e neurodegeneração (Navarro e Boveris, 2007 e 2010; Winklhofer e Haass, 2010).

Como as mitocôndrias são as maiores fontes de ATP e de ERO (espécies reativas de oxigênio) em neurônios, elas possuem um papel importante na DP (Navarro e Boveris, 2010). Várias proteínas mitocondriais exercem efeitos de proteção contra a morte neuronal

induzida por cálcio (Ca^{2+}) incluindo proteínas pró e antiapoptóticas que modificam a permeabilidade da membrana mitocondrial e proteínas antioxidantes e desacopladores que reduzem a produção de ERO na mitocôndria (Chan, 2006; Hoppins et al., 2007; Knott e Bossy-Wetzel, 2008; Kerr et al., 2010; Aleixo et al., 2012).

As especulações de que anormalidades mitocondriais estariam relacionadas com a etiopatogenia da DP surgiram após a definição da existência de redução da atividade do complexo I mitocondrial; Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH); quinona oxirredutase, bem como o aumento da inibição do complexo α -cetoglutarato desidrogenase (Knott e Bossy-Wetzel, 2008; Aleixo et al., 2012). Essa disfunção mitocondrial foi reforçada pelos estudos de parkinsonismo induzido pela exposição à 6-OHDA, com evidência da presença de inibição seletiva do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial na SNpc do mesencéfalo, contribuindo para uma lesão e consequente morte neuronal (Schapira, 1999; Fornai et al., 2005).

Especificamente sobre a inibição do complexo I, duas consequências tornam-se evidentes: a depleção do ATP, que consequentemente prejudica os processos celulares dependentes de ATP, e a geração excessiva de ERO culminando em estresse oxidativo (Aguiar et al., 2008).

1.6 ESTRESSE OXIDATIVO E A DOENÇA DE PARKINSON

Para Moreira et al (2004), o dano oxidativo a macromoléculas biológicas é o ponto marcante da maioria das doenças neurodegenerativas como a DP. Dados da literatura apontam o envolvimento da homeostase de Ca^{2+} na disfunção mitocondrial e na produção de radicais livres (RL), provocando alterações relevantes na função cerebral e conseqüentemente, no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Przedborski et al., 2003; Vila et al., 2003; Aguiar et al., 2007).

Embora os mecanismos moleculares da DP ainda não estejam totalmente compreendidos, vários estudos sugerem que as alterações do metabolismo celular, como redução da fosforilação oxidativa mitocondrial (Mandemakers et al., 2007; Mounsey e Teismann, 2011; Pacelli et al., 2011; Wen et al., 2011) e a geração de radicais livres (RL) (Zhou et al., 2008; Baillet et al., 2010; Surendran e Rajasankar, 2010) desempenham um importante papel na patogênese da DP, pois o cérebro possui um grande potencial oxidativo pelo alto consumo de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 2007). No entanto, a capacidade do

cérebro é limitada em suportar o estresse oxidativo, pois o mesmo possui elevadas quantidades de ácidos graxos poliinsaturados, os quais são facilmente oxidados por RL, acúmulo de Fe^{2+} e baixos níveis de antioxidantes, enzimas e substratos (Jenner, 2003), o que sugere a necessidade de intervenções que poderiam prevenir ou diminuir a geração dos danos oxidativos pela DP.

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). Como em qualquer outro tecido o estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC) depende do equilíbrio entre a produção das ERO, espécies reativas de nitrogênio (ERN) e o sistema de defesa antioxidante. As ERO (incluindo os radicais superóxido - O_2^- - hidroxila - OH^\cdot e peróxido de hidrogênio - H_2O_2) e as ERN (incluindo o peróxinitrito - $ONOO^-$, que é a ERN com maior potencial reativo são as principais causas do estresse oxidativo no SNC (Halliwell e Guteridge, 2007). Os danos oxidativos gerados por esse desequilíbrio prejudicam a função celular, especificamente por atacar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Halliwell e Guteridge, 2007).

Todos os organismos aeróbicos são suscetíveis à ação das ERO produzidas pela mitocôndria durante a respiração ou em outros eventos celulares (Calabrese et al., 2007). A quantidade de ERO produzida é aproximadamente 2-5% do total do oxigênio consumido durante a respiração (Halliwell e Guteridge, 2007).

Várias vias podem estar associadas com a formação das ERO, podendo haver uma relação direta com a reação de Fenton ou por via indireta envolvendo a ativação de enzimas como fosfolipases e óxido nítrico sintase (NOS) (Calabrese et al., 2007). Foram encontrados, níveis reduzidos de glutathiona (GSH), que constitui o principal sistema redox de controle do estresse oxidativo, em amostras de SNpc de pacientes *post mortem* com a DP (Maetzler et al., 2011). Embora seja evidente a diferença entre as estruturas cerebrais, a SNpc é altamente suscetível ao estresse oxidativo por conter uma elevada população de neurônios dopaminérgicos que produz quantidades significativas de ERO (Gandhi e Wood, 2005). Adicionalmente, tem sido sugerido que o estresse oxidativo leva à ativação de caspases e consequente apoptose na DP (Friedlander et al., 2003), como também pode levar ou potencializar reações inflamatórias crônicas causando modificações em várias biomoléculas. Klein e Ackerman (2003) observaram que neurônios dopaminérgicos na SNpc de cérebros de pacientes com DP exibiram marcadores de estresse oxidativo, como peroxidação lipídica, oxidação

de proteína e de ácidos nucleicos e alterações no sistema de defesa antioxidante.

A presença de níveis aumentados de ERO promove uma neurodegeneração seletiva na DP. Uma das explicações é a auto-oxidação da DA (Miyazaki et al., 2006; Tsang e Chung, 2009). No interior das células, a DA pode ser degradada pela monoamino oxidase A (MAO-A), ou sofrer auto-oxidação. A metabolização da DA pela MAO-A produz o ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) consumindo água (H_2O) e oxigênio (O_2). Já a sua auto-oxidação intracelular, gera H_2O_2 e DA-quinona que pode levar à modificação das proteínas diretamente (Hald e Lotharius, 2005; Tsang e Chung, 2009). O H_2O_2 , na presença de Fe^{2+} , através da reação de Fenton, pode ser convertido em radical hidroxila (OH^\cdot), os quais são altamente reativos e podem reagir com praticamente qualquer macromolécula celular. O desequilíbrio energético relacionado pode levar ao rompimento de vesículas que armazenam a DA, aumentando sua concentração no citosol e ocasionando danos às macromoléculas (Dauer e Przedborski, 2003). Além disso, as ERO e ERN estão envolvidas em processos apoptóticos e em mecanismos de excitotoxicidade (Dauer e Przedborski, 2003; Miyazaki et al., 2006).

A cadeia transportadora de elétrons, em particular o complexo I e III, é a principal fonte de formação de ERO (Dauer e Przedborski, 2003; Miyazaki et al., 2006). A baixa produção de ATP e a alta razão de Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido e oxidado ($NADH/NAD^+$) na matriz, por exemplo, são condições que favorecem à formação de $O_2^{\cdot-}$ no complexo I da mitocôndria (Winklhofer e Haass, 2010). De acordo com Halliwell e Guteridge (2007), a produção de $O_2^{\cdot-}$ nesse complexo é significativamente aumentada durante o transporte reverso de elétrons que ocorre quando o fornecimento de elétrons a partir do succinato (aumentado durante o exercício e em condições de hipoxia), do glicerol-3-fosfato ou da oxidação de ácidos graxos, por reduzir a ubiquinona para ubiquinol, direcionando os elétrons para o complexo I. Nessas condições a NAD^+ é reduzida para $NADH$ e o ubiquinol é oxidado para ubiquinona (Dauer e Przedborski, 2003; Miyazaki et al., 2006).

1.7 NEUROINFLAMAÇÃO NA DOENÇA DE PARKINSON

A Neuroinflamação desempenha um importante papel na neurodegeneração de neurônios nigrostriatais (Bolin et al., 2002; Di Filipe et al., 2010). Estudos demonstraram que a inflamação esta associada à ativação microglial, na substância nigra, e a baixa regulação

do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (McGeer et al., 1988; Rowe et al., 1998; Johnston et al., 2008; Brothers, et al., 2013). A microglia é constituída pelas células residentes imunocompetentes do SNC e tem a função de monitorar o cérebro contra patógenos e lesões. Isto sugere que a patogênese subjacente envolve uma complexa resposta na via nigroestriatal, e que o sistema imune inato desempenha um papel significativo (Mcgeer et al., 2003; Lane et al., 2008; Johnston et al., 2008). A neuroinflamação é regulada por muitas moléculas de sinalização, incluindo citocinas (Esposito et al., 2007; Tansey et al., 2007), as quais desempenham um papel no desenvolvimento normal do cérebro, assim como no processo imuno-patológico após a lesão e neurodegeneração (Manthripragada et al., 2011). Quando ativadas, segregam uma matriz complexa de mediadores adicionais, citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas, ERO e proteínas, que podem exercer efeito tóxico sobre o sistema dopaminérgico (Mcgeer et al., 2003; Lane et al., 2008).

Os estudos relatam níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como interferon-gama (IFN- γ), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-17 (IL-17) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), assim como o fator de transformação de crescimento-1 beta (TGF- β 1) expressos por células gliais, na região nigroestriatal de pacientes com DP (McGeer et al., 1988; Liberatore et al., 1999; Wu et al., 2003; Sawada et al., 2006; Brodacki et al., 2008; Tansey et al., 2008; Li et al., 2009). A presença destes mediadores pró-inflamatórias contribui para o aumento da ativação da microglia. De acordo com Orr et al. (2002), citocinas associadas aos fatores liberados por células dopaminérgicas parecem ampliar e sustentar a neuroinflamação, como também, as respostas imunes que conduzem a destruição irreversível dos neurônios dopaminérgicos do SNC. Adicionalmente as citocinas derivadas da ativação microglial podem ser potencialmente tóxicas ao se ligarem nos seus receptores neuronais, e também podem induzir enzimas microgliais como a mieloperoxidase (MPO), Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase (iNOS) e NADPH oxidase, potencializando o mecanismo de oxidação de biomoléculas. Portanto, a redução da atividade destas enzimas, em modelos animais de DP reduz a perda neuronal, bem como os sinais e sintomas da doença (Hirsch e Hunot, 2009; Witte et al., 2010).

Outro fator a ser considerado na neuroinflamação na DP é a neurotoxicidade e ativação do fator nuclear Kb (NF-kB), o qual medeia processos inflamatórios, estando envolvidos no estresse oxidativo cerebral (Lane et al., 2008).

1.8 EXERCÍCIO FÍSICO NA DOENÇA DE PARKINSON

As intervenções terapêuticas de rotina, especialmente as ações farmacológicas, têm contribuído significativamente para o tratamento das doenças neurodegenerativas, contudo apresentam limitações. Acredita-se que o exercício físico regular exerça um efeito positivo sobre a resposta neuroquímica (Carvey et al., 2006; Aguiar et al., 2007; Tuon et al., 2012), comportamental (Petzinger et al., 2007), mitocondrial (Bloomer et al., 2008; Elokda et al., 2010) e inflamatória (Miller et al., 2012; Tan, 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 (Da cunha et al., 2007; Tuon et al., 2010). Adicionalmente, diversos outros parâmetros neuroquímicos respondem diferenciadamente conforme a especificidade do exercício.

Deste modo, o exercício físico de intensidade leve a moderada surge como estratégia neuroprotetora (Tuon et al., 2012). Evidências científicas sustentam os benefícios ao metabolismo oxidativo em áreas cerebrais de roedores submetidos ao exercício de intensidade leve a moderada (Radák et al., 1995; Somani et al., 1996; Carvey et al., 2006; Aguiar et al., 2007), e oposto quando submetidos ao exercício intenso (Aguiar et al., 2008). O treinamento físico moderado aprimora o aprendizado e a memória (Radák et al., 2001), como também a coordenação motora (Petzinger et al., 2007). No que se refere aos marcadores neuroquímicos, o treinamento reduz os níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas no estriado, cerebelo, hipocampo e córtex cerebral (Radák et al., 2001; Ogonovszky et al., 2005; Jolitha et al., 2006, Aguiar et al., 2007; Tuon et al., 2012) e aumenta os níveis de DA no estriado (Tillerson et al., 2003; Petzinger et al., 2007), assim como diminui a atividade do transportador de dopamina (DAT) aumenta a expressão de receptores dopaminérgicos-D2 (Fisher et al., 2004).

Estudos demonstraram que o exercício físico melhora a função cognitiva, neuroquímica e mitocondrial em modelos experimentais (Bloomer et al., 2008; Elokda et al., 2010; Tuon et al., 2010; Aguiar et al., 2011; Lin et al., 2012; Pietrelli et al., 2012; Dutra et al., no prelo), além de ter efeito neuroprotetor (Tajiri et al., 2010; Funk et al., 2011). Contudo, os mecanismos responsáveis por estes efeitos neuroprotetores são pouco compreendidos e não tem sido amplamente investigados. Tajiri et al., (2010) mostrou que o exercício exerce efeitos

neuroprotetores no sistema dopaminérgico e aumenta a migração neuronal, pelo menos em parte, através da modulação do microambiente, incluindo a regulação de BDNF e o fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF), aumento da neurogênese e diferenciação celular. No entanto, nenhum estudo foi realizado para mostrar o efeito neuroprotetor do exercício em parâmetros de estresse oxidativo em modelos experimentais de DP.

O exercício moderado desencadeia respostas regulatórias que retardam, pelo menos em parte, o declínio mitocondrial do cérebro, assim como, o aumento do estresse oxidativo e diminuição das atividades enzimáticas mitocondriais (Navarro et al., 2004; Arcoverde et al., 2008; Goodwin et al., 2008; Lautenschlager et al., 2008; Dibble et al., 2009; Weintraub e Morgan, 2011; Tuon et al., 2012). O treinamento de resistência envolve uma série de adaptações geralmente levando à regulação positiva de mecanismos de proteção de tecido (Somani e Husain, 1996; Goto et al., 2007). Estas adaptações incluem o aumento da biogênese mitocondrial e redução inflamatória com aumento concomitante no sistema antioxidante, o que leva a um controle mais eficaz da produção de RL. Contudo, as mitocôndrias são organelas essenciais envolvidas na adaptação bioenergética dos neurônios, aumento da atividade neuronal e plasticidade sináptica em resposta ao exercício (Dietrich et al., 2008).

1.9 MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-OHDA

Modelos experimentais de DP são de grande importância, contribuindo para o avanço do conhecimento científico, refletindo as características da doença, simulando alterações histológicas, patológicas e bioquímicas, assim como proporcionando a busca de novas estratégias de proteção dos neurônios dopaminérgicos (Ungerstedt 1968; Decressac et al., 2012). Como a DP não se manifesta espontaneamente em animais, os sinais e sintomas são observados quando da utilização de agentes neurotóxicos, como a 6-OHDA, MPTP ou a rotenona (Schwartz et al., 1996).

A 6-OHDA foi a primeira neurotoxina descoberta para a indução de morte seletiva de células catecolaminérgicas, há cerca de 30 anos (Decressac et al., 2012). Desde então, é utilizada em modelos de DP em várias espécies de animais (Choe et al., 2012), por possuir alta afinidade pelos transportadores catecolaminérgicos da membrana

plasmática, como o DAT, e o transportador de norepinefrina (Lindgren et al., 2012). A interação com as catecolaminas podem causar danos tanto nos neurônios dopaminérgicos, quanto nos neurônios noradrenérgicos, do SNC e periférico (Da Cunha et al., 2008; Galindo et al., 2012).

Uma vez administrada no cérebro, a 6-OHDA produz espécies citotóxicas através de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Choi et al., 1999; Lindgren et al., 2012), dentre eles a sua auto-oxidação, gerando o H_2O_2 , ERO e quinonas que agridem os grupos nucleófilos endocelulares e levam a oxidação da DA pela MAO formando H_2O_2 , induzindo a produção de ERO adicionais (Blum et al., 2001). Estudos mostram que a 6-OHDA pode agir diretamente na mitocôndria inibindo o complexo I, contribuindo para um ambiente celular propício a produção de ERO e consequentemente ao estresse oxidativo (Choe et al., 2012; Galindo et al., 2012; Tuon et al., 2012).

A injeção de 6-OHDA é comumente associada à administração de bloqueadores do transportador de noradrenalina (NA), como a desipramina, com o objetivo de reduzir a captação desta neurotoxina por neurônios noradrenérgicos e aumentar a seletividade para neurônios dopaminérgicos. A Figura 3 mostra os mecanismos de toxicidade da 6-OHDA e a ação da desipramina, um inibidor de recaptação de NA (Kwon et al., 2010).

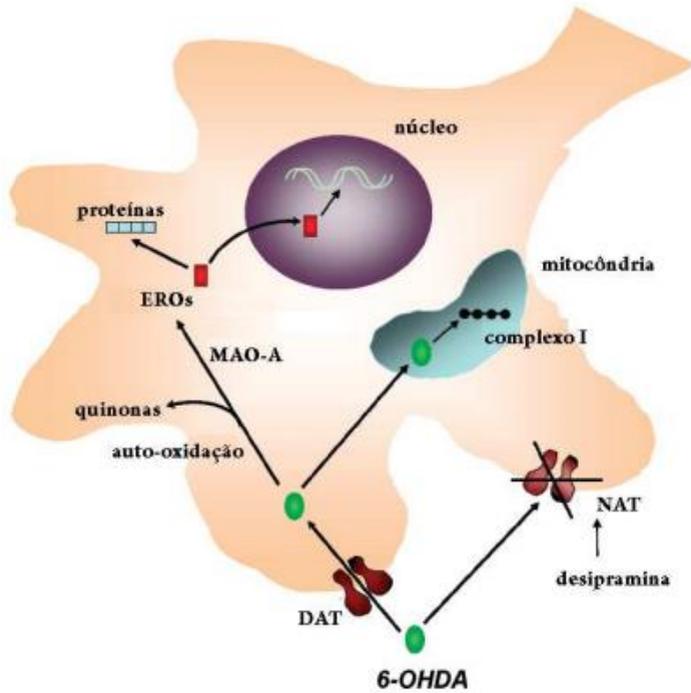


Figura 3: Mecanismos de neurotoxicidade induzido por 6-OHDA. DAT – transportador de DA; EROS - espécies reativas de oxigênio; NAT - transportador de NA (Simola et al., 2007).

A injeção de 6-OHDA no corpo do estriado produz uma degeneração retrógrada lenta do sistema nigroestriatal (Lee et al., 1996), mimetizando a progressão da DP e viabilizando a investigação de tratamentos neuroprotetores (Georgievska et al., 2002). A 6-OHDA é incapaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica (Choe et al., 2012; Galindo et al., 2012; Tuon et al., 2012), devendo ser injetada diretamente através de cirurgia estereotáxica no estriado, na SNpc ou no feixe prosencefálico medial (FPM). Após 24 horas da sua administração, inicia-se a morte neuronal, chegando em níveis máximos de redução de DA estriatal entre 3 a 4 dias após a lesão (Galindo et al., 2012). O evento acontece associado a uma redução de recaptação de catecolaminas, de neurônios imunorreativos para a enzima tirosina

hidroxilase (TH) e diminuição nos níveis de metabólitos das catecolaminas (Choe et al., 2012).

A indução unilateral da DP diretamente na SNpc com a 6-OHDA leva à morte seletiva de neurônios dopaminérgicos (Kwon et al., 2010). Os animais acometidos com a lesão apresentam um comportamento motor assimétrico, fazendo com que o próprio animal seja controle dele mesmo, ou seja, mostra um modelo hemiparkinsoniano (Da Cunha et al., 2008). Quando são submetidos a algum agonista dopaminérgico, como a L-Dopa e apomorfina, utilizado neste trabalho, os neurônios dopaminérgicos agem estimulando a liberação da DA, gerando uma discreta assimetria no corpo e um comportamento rotatório contralateral à lesão, podendo ser quantificado no teste do rotarômetro (Da Cunha et al., 2008). A administração de apomorfina, como utilizado nos estudos (Figura 4), gera movimento de rotação contralateral, logo após sua aplicação, comprovando a destruição da SNpc na indução da supersensibilização pós-sináptica que ocorre nos receptores dopaminérgicos do estriado ipsilateral (Schwartz et al., 1996; Kwon et al., 2010; Galindo et al., 2012).



Figura 4: Representação do camundongo com lesão na SNpc por 6-OHDA, sob injeção de Apomorfina exhibe rotação contralateral à lesão (Da Cunha et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes protocolos de exercício físico sobre parâmetros comportamentais e neuroquímicos em um modelo experimental de doença de Parkinson, induzido por 6-OHDA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do treinamento físico sobre os níveis de enzimas antioxidantes em estriado de animais submetidos ao modelo de DP induzido pela 6-OHDA;
- Avaliar os efeitos do treinamento físico sobre de danos oxidativos em estriado de animais submetidos ao modelo de DP induzido pela 6-OHDA;
- Avaliar os efeitos do treinamento físico sobre as neurotrofinas em estriado de animais submetidos ao modelo de DP induzido pela 6-OHDA;
- Avaliar os efeitos do treinamento de força e o treinamento aeróbio em esteira sobre o comportamento de camundongos submetidos ao modelo de DP induzido pela 6-OHDA;
- Avaliar os efeitos do treinamento de força e o treinamento aeróbio em esteira sobre os níveis de neurotrofinas no estriado e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DP induzido pela 6-OHDA;
- Avaliar os efeitos do treinamento de força e o treinamento aeróbio em esteira sobre o a função mitocondrial no estriado e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DP induzido pela 6-OHDA;
- Avaliar os efeitos do treinamento de força e o treinamento aeróbio em esteira sobre os mediadores inflamatórios no estriado e hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de DP induzido pela 6-OHDA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício e no Laboratório de Neurociências da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes brasileiras para uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794; DOU 27/05/13; MCTI n° 7). Este projeto foi executado após aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense (CEUA) sob o protocolo número 113/2011.

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL



Figura 5: Desenho experimental do primeiro experimento.



Figura 6: Desenho experimental do segundo e terceiro experimento.

3.2 EXPERIMENTO 1

3.2.1 Amostras: Trinta e seis ratos machos da linhagem Wistar, com 2 meses de idade, pesando 250-300 g. Os ratos foram obtidos do biotério da Unesc e foram acondicionados em 5 animais por caixa, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 - 19:00) (Claro das 7:00 - 19:00) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido a temperatura de $23 \pm 1^\circ \text{C}$. Os animais foram randomicamente divididos em 4 grupos (n=8): Grupo Sham (animal sem treinamento + cirurgia estereotáxica + salina), Grupo sem treinamento + DP (animal treinado + cirurgia estereotáxica + 6-OHDA), Grupo Treinado (animal treinado + cirurgia estereotáxica +

salina), Grupo Treinado + DP (animal treinado + cirurgia estereotáxica + 6-OHDA).

3.2.2 Protocolo de treinamento: Todos os animais foram ambientados em uma esteira ergométrica, com nove canais ($10 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, sem inclinação, $10 \text{ min}\cdot\text{dia}^{-1}$) durante uma semana, com o objetivo de reduzir o estresse no ambiente novo. Os ratos não receberam nenhum estímulo para correr. Após este período, os animais treinados que tiveram uma boa resposta durante a adaptação do treinamento, foram selecionados a um programa de treinamento de corrida com níveis progressivos de intensidade ($13\text{-}17 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$, sem inclinação) durante 3 a 4 dias por semana, durante 8 semanas, por um período total de 60 dias. Cada treinamento foi de 50 min, com um intervalo de 48 h entre os treinamentos. Os animais que não treinaram foram apenas expostos à esteira nas mesmas condições de treinamento, porém sem a prática do exercício.

3.2.3 Procedimentos cirúrgicos: A indução do modelo animal da doença de Parkinson foi realizada 24 horas após a última sessão de treinamento. Os animais foram inicialmente pesados, seguido da administração da desipramina (25 mg/kg), um antidepressivo tricíclico, que inibe a recaptação de noradrenalina.

Sob efeito da anestesia (xilazina, 67 mg/kg , i.p e cetamina, 33 mg/kg , i.p), a tricotomia na cabeça dos animais foi realizada. Os animais foram posicionados em um estereotáxico (Insight instrumentos - Riberão Preto, SP, Brasil). Após assepsia local com álcool iodado (70%), uma incisão na pele na linha média foi feita com a perfuração posterior do crânio. A administração de 6-OHDA ($20 \mu\text{g}$ em $4 \mu\text{l}$ resultando em uma solução de $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ dissolvido em solução salina a 0,9 % contendo $0,2 \text{ mg/ml}$ de ácido ascórbico, Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi realizada no estriado direito com uma micro-seringa de Hamilton 30 gauge de $10 \mu\text{l}$, e incorporado em uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, EUA) utilizando as seguintes coordenadas: anterior ($5,0 \text{ mm}$ do bregma), médio-lateral ($2,1 \text{ mm}$ a partir da linha média), e dorso-ventral ($-7,7 \text{ milímetros}$ do crânio) adaptado por Paxinos e Watson (2004). A taxa de injeção foi de $1 \mu\text{l}/\text{min}$. Após a injeção, a seringa foi mantida no mesmo local, durante 5 min antes de ser lentamente removida, para evitar refluxo. Após o procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose única de Butorfanol (100 mg , i.p.) como analgesia e sofreram eutanásia 7 dias após a administração de 6-OHDA.

3.3 EXPERIMENTO 2 e 3

3.3.1 Amostras: Setenta e dois camundongos machos da linhagem C57BL, com 2 meses de idade, pesando 20-30 g. Os camundongos foram obtidos do biotério da Unesc e foram acondicionados em 5 animais por caixa, com ciclo claro - escuro de 12 horas (07:00 - 19:00) (Claro das 7:00 - 19:00) e comida e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido à temperatura de $23 \pm 1^\circ$ C. Os animais foram divididos randomicamente em 6 grupos (n=12): Grupo Sham (animal sem treinamento + cirurgia estereotáxica + salina), Grupo Treinamento com força (cirurgia estereotáxica + salina), Grupo Treinamento em esteira (cirurgia estereotáxica + salina) Grupo DP (animal sem treinamento + cirurgia estereotáxica + 6-OHDA), Grupo Treinamento com força + DP (cirurgia estereotáxica + 6-OHDA), Grupo Treinamento em esteira + DP (cirurgia estereotáxica + 6-OHDA).

3.3.2 Protocolos de treinamento:

Treinamento em Esteira: Ver descrição no item anterior 3.2.1, no experimento 1.

Treinamento de força: O treinamento foi realizado de acordo com Hornberger e Farrar (2004), utilizando um aparato, com 1 metro de altura, contendo 20 degraus, com 2 centímetros de espessamento entre os mesmos, e 85° de inclinação. Os animais foram inicialmente ambientados por 3 dias consecutivos. Quarenta e oito horas após a familiarização, o treinamento de resistência foi iniciado utilizando tubos com pesos presos à cauda. Os camundongos foram posicionados na base do aparelho e motivados à subir a escada por 3 séries de 8 à 12 repetições com 1 minuto de descanso entre as repetições e 2 minutos entre as séries. O peso inicial foi de 50%, aumentando gradualmente ao longo das 8 semanas de treinamento (1° e 2° semanas, 50%; 3° e 4° semanas, 60%; 5° e 6° semanas, 80%; 7° e 8° semanas, 100%). As sessões de treinamento foram conduzidas 3 ou 4 vezes por semana. Cada sessão teve uma duração de 40-50 minutos, com um intervalo de 48 horas entre as sessões. Os camundongos foram estimulados manualmente para fornecer motivação para subir quando necessário.

3.3.3 Procedimentos cirúrgicos: Os procedimentos para a indução do modelo experimental da DP, por 6-OHDA, foram os mesmos já descritos no item anterior 3.2.2 (experimento 1), com as seguintes mudanças:

O anestésico utilizado neste experimento, foi o Equitesin 3 ml/kg (i.p.) (1 g de tiopental, 4,25 g de hidrato de cloral, 42,8 ml de propileno glicol, 11,5 ml de álcool 90%, 45,7 ml de água destilada e 2,13 g sulfato de magnésio), agindo na prevenção da morte de neurônios dopaminérgico, para a realização da cirurgia estereotáxica.

Os animais lesionados com 6-OHDA (8µg em 4 µL igual a 2 µg/µL dissolvido em solução salina a 0,9 % contendo 0,2 mg/ml de ácido ascórbico, Sigma, St. Louis, MO, EUA), receberam uma injeção unilateral no corpo do estriado direito, conforme o procedimento por Branchi et ai. (2010). Para a cirurgia foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas, a partir do bregma: AP = 1 centímetro; ML = ± 1,7 centímetro; DV = -2,9 mm, de acordo com as coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Franklin (2000), utilizando uma micro-seringa de Hamilton 30 gauge de 10 µl, e incorporado em uma bomba de infusão (BI Visão 2000), a uma taxa de injeção de 0,5µL/min durante 8 min. Após a injeção, a seringa foi mantida no local por 3 minutos antes de ser removida lentamente (1 mm/min), para evitar refluxo. Os animais do grupo controle (Sham) receberam o mesmo volume de veículo utilizando um procedimento idêntico. Os animais foram sacrificados 7 dias após a indução de 6-OHDA. Após o procedimento cirúrgico, foi administrado nos animais Butorfanol (1 ml por dose única de 100 kg, i.p.) como agente analgésico.

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.4.1 Teste do Rotarômetro: Uma semana após a cirurgia, os animais receberam uma injeção de 1 mg/kg de apomorfina (s.c). Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados individualmente em um recipiente cilíndrico de plástico, medindo 28 cm de diâmetro e 25 cm de altura, onde foi contado o número de voltas para ambos os lados, lado lesionado (ipsolateral) e o lado oposto (contralateral). O número de voltas em torno do seu próprio eixo foi contado ao longo de um período de 1 h (voltas/h) de acordo (Ungerstedt e Arbuthnott, 1970).

3.4.2 Teste de Campo-Aberto (Open Field- OFT): O comportamento da atividade exploratória e locomotora dos camundongos foi avaliada no OFT (Kaster et al, 2005; Salehi-Sadaghiani et al, 2012). O aparelho consistia em uma caixa de madeira medindo 40 × 60 × 50 centímetros. O piso da arena foi dividido em 12 quadrados iguais. O animal foi suavemente colocado no lado direito do campo aberto e foram autorizados a explorar livremente a área durante 6 minutos. Três

parâmetros foram obtidos ao longo deste ensaio: locomoção (número de cruzamentos de um retângulo para o outro); exploratória (número de vezes que os animais estavam apoiados em suas patas traseiras) e o tempo de imobilidade (número de segundos em que o animal ficou parado, durante o teste). Após cada teste, o aparelho higienizado com uma solução de etanol a 10%. A luz no interior do aparelho foi mantida no mínimo para evitar comportamentos relacionados à ansiedade.

3.4.3 Teste de nado forçado: Imediatamente após o teste de campo aberto, os camundongos foram colocados individualmente em um recipiente cilíndrico aberto, contendo 19 cm de água a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 10 cm de diâmetro e altura de 25 cm. Os camundongos foram submetidos a natação durante 6 minutos. Cada camundongo foi considerado imóvel na água quando deixou de nadar e permaneceu em movimento flutuante, fazendo com que apenas os movimentos necessários eram mantidos com sua cabeça para fora da água. A duração da imobilidade foi registrada durante os 4 últimos minutos do teste (Porsolt et al., 1977; Ghasemi et al., 2009).

3.5 PROCEDIMENTO DE EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Imediatamente após os testes comportamentais, os animais foram mortos por decapitação, e o estriado e o hipocampo foram removidos cirurgicamente e processados. A amostra foi homogeneizada em tampão específico e usada para análises de proteína intracelular por western blot. A amostra foi homogeneizada em tampão contendo 1% Triton 100, Tris 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio a 100 mM, EDTA 100 mM, vanadato de sódio a 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,1 mg/mL a 4°C . O homogeneizado foi então centrifugado a 3.000 g durante 40 min. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas, o extrato total e o tecido restante foi armazenado em freezer - 70°C para posteriores análises.

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Análises de proteínas por western blot: As proteínas foram desnaturadas em tampão de amostra de Laemmli (1970), contendo DTT 100 mM. Após isto, 0,2 mg de extratos protéicos obtidos a partir de cada tecido foram separadas por SDS-PAGE, transferidos para membranas de nitrocelulose e colocados a hibridar com anticorpos anti-tirosina-hidroxilase (TH), anti- fator neutrófico derivado do encéfalo (BDNF),

anti- α -sinucleína, anti-retículo sarcoplasmático Ca^{2+} - ATPase (SERCA II), anti-superóxido dismutase (SOD), anti-catalase (CAT), e anti-glutationa peroxidase (GPX), anti-pró fator neurotrófico derivado do cérebro (pró-BDNF), anti-fator de crescimento neurotrófico de tirosina cinase (TrkB), anti-fator nuclear kappa B (NF- κ B) e anti-Sirtuina 1 (Sirt1) de anticorpos. Os anticorpos foram fornecidos por Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). A detecção quimioluminescente foi realizada usando anticorpos secundários conjugados com peroxidase. A visualização das bandas de proteínas foi realizada por exposição das membranas com filme de RX. As autoradiografias das membranas foram levadas para a visualização das bandas de proteína. Os resultados das manchas são apresentados com direito de comparações das bandas nas autorradiografias e foram quantificadas por densitometria utilizando o software Scion Image. β -actina e α -tubulina são utilizados como proteínas de carga para a técnica de Western blot.

3.6.2 Marcadores de danos oxidativos: Os danos oxidativos em lipídios foram realizados usando o método desenvolvido por Draper e Hadley (1990). Uma porção do estriado foi misturado com 1 ml de ácido tricloroacético a 10 % e 1 ml de 0,67 % de ácido tiobarbitúrico; subsequentemente, estes foram aquecidos em banho maria por 15 min. Substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico foram determinados à 532 nm, e os resultados foram expressos em TBARS nmol/mg de proteína. Os danos oxidativos em proteínas foram determinados de acordo com Levine e colaboradores (1990). O conteúdo modificado de proteínas foi mensurado pela formação de grupos carbonilas derivados pela reação gerada pela 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH). Estes derivados foram extraídos seqüencialmente com 10 % (v/v) de ácido tricloroacético, seguido por lavagem com etanol/acetato de etila, 1:1 (v/v), e re-extração com 10 % de ácido tricloroacético. O precipitado resultante foi dissolvido em uréia 6M. A diferença na absorbância entre DNPH e HCl foi observada à 370 nm. Os resultados foram expressos como nmol de carbonila por mg de proteína.

3.6.3 Determinação dos níveis de citocinas: As amostras do estriado e hipocampo foram homogeneizadas em tampão de fosfato contendo 0,05% de Tween 20, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,1 mM, cloreto de benzetonio 0,1 mM, EDTA a 10 mM e 20 UI aprotinina. O homogeneizado foi centrifugado a 3000 x g por 10 minutos e os sobrenadantes foram armazenados a -70°C para posteriores análises. O

fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-17 (IL-17), interferon gama (INF- γ) e os níveis do fator de transformação de crescimento 1-beta (TGF- β 1) foram avaliados com enzimas ligadas ao ensaio imunoabsorventes (ELISA), usando kits de R&D Systems, de acordo com as recomendações do fabricante.

3.6.4 Determinação da atividade enzimática do complexo I: A atividade do complexo I foi determinada de acordo com Cassina e Radi (1996), e é baseada na atividade da NADH desidrogenase pela taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm. A atividade do complexo I foi medida antes da adição de rotenona (20g/mL) e a absorbância foi acompanhada durante outros 5 minutos. A atividade do complexo I foi determinada como atividade sensível à rotenona expressas em nmol/min/mg proteína.

3.6.5 Determinação de nitrato/nitrito (NOx): Como índice indireto da produção de NO, foi determinado espectrofotometricamente a formação de nitrito (NO₂). As amostras foram incubadas com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 0,1 mol/L de HCl e 0,1% de N-(1-naftil) etilenodiamina, dicloridrato) à temperatura ambiente durante 10 min. Em seguida, a absorbância foi medida a 540 nm usando um leitor de microplacas. O teor de nitrito foi calculada com base numa curva padrão construída com NaNO₂ (Chae et al., 2004).

3.6.6 Determinação de proteínas totais: O teor de proteína foi determinado usando albumina bovina do soro como padrão (Lowry et al., 1951). O conteúdo total de proteína foi mensurado utilizando o reagente folin-fenol (reagente fosfomolibdico-fosfotúngstico) foi adicionado para ligar a proteína. O reagente ligado foi lentamente reduzido e alterado de amarelo para azul. A absorbância de 750 nm foi utilizado.

3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média e erro padrão da média (média \pm EPM). As variáveis comportamentais foram analisadas quanto à normalidade da distribuição usando o teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância foi avaliada entre os grupos por meio do teste de Levene. As diferenças entre os grupos experimentais foram determinados por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste post-hoc de Tukey. O nível de significância estabelecido foi de 95% ($p < 0,05$). O software utilizado para a análise dos dados foi o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 16.0 para Windows.

4 RESULTADOS

O presente estudo avaliou o efeito do treinamento físico sobre parâmetros comportamentais e marcadores neuroquímicos de estresse oxidativo, inflamação, função mitocondrial no estriado e hipocampo de ratos e camundongos, submetidos a um modelo animal de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA. Modelos de treinamento físico promovem mudanças comportamentais e neuroquímicas semelhantes no estriado e hipocampo de animais, sugerindo um mecanismo de neuroproteção.

Os resultados estão descritos, conforme a ordem dos experimentos 1, 2 e 3.

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1 Teste de rotarômetro: uma assimetria rotacional foi observada nos animais do grupo Sham ($11,8 \pm 1,4$ voltas/h) e dos grupos TR ($8,5 \pm 3,8$ voltas/h), enquanto os animais do grupo submetidos à injeção de 6-OHDA exibiram uma assimetria rotacional significativa (DP = $102,2 \pm 14,3$ voltas/h; TR+DP = $51,35 \pm 6,38$ volta/h) em relação ao grupo Sham. No entanto, uma diminuição significativa no número de rotações foi observada no grupo exercício ($169,72 \pm 30,4$ voltas/h) em relação ao grupo DP (Figura 7).

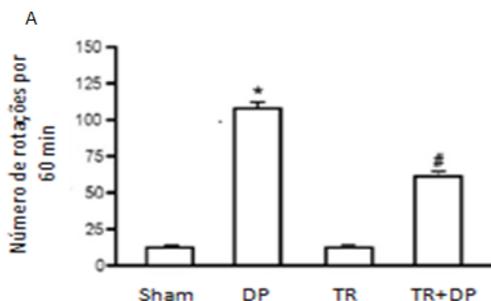


Figura 7. Efeitos do treinamento físico sobre os valores do teste de rotarômetro (figura 7A) em animais expostos a 6-OHDA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM (n=8). A diferença significativa utilizando a relação do grupo sham e TR (*) e em relação à DP (#) foi de $p < 0,05$. Sham = destreinado + sham-operado, DP = destreinado + DP, TR = treinado + sham-operado, e TR+DP = treinado + DP.

4.1.2 Níveis de TH, BDNF, α -sinucleína e SERCA II: Os níveis de TH no estriado é apresentada na Figura 8A. O Grupo DP exibiu 55% de redução nos níveis de TH em relação ao grupo Sham, mas esta redução não foi significativa nos animais expostos apenas ao exercício. No entanto, o grupo TR + DP exibiu 59 %, um nível maior, comparado com o grupo DP. Como mostrado na Figura 8B, os valores encontrados nos níveis de BDNF foram relativamente semelhantes aos níveis de TH. O nível de BDNF no grupo DP foi de 35 % menor do que no grupo Sham, enquanto que os animais expostos apenas ao exercício não apresentaram diferença significativa. No entanto, o grupo TR + DP mostrou um nível elevado, de 33 %, em comparação com o grupo DP. Os níveis de α -sinucleína e SERCA II são mostrados nas Figuras 8C e 8D. No grupo DP, a α -sinucleína aumentou 85 % e a SERCA II reduziu 48%, enquanto que na presença do exercício, estes valores retornaram aos níveis próximos ao controle.

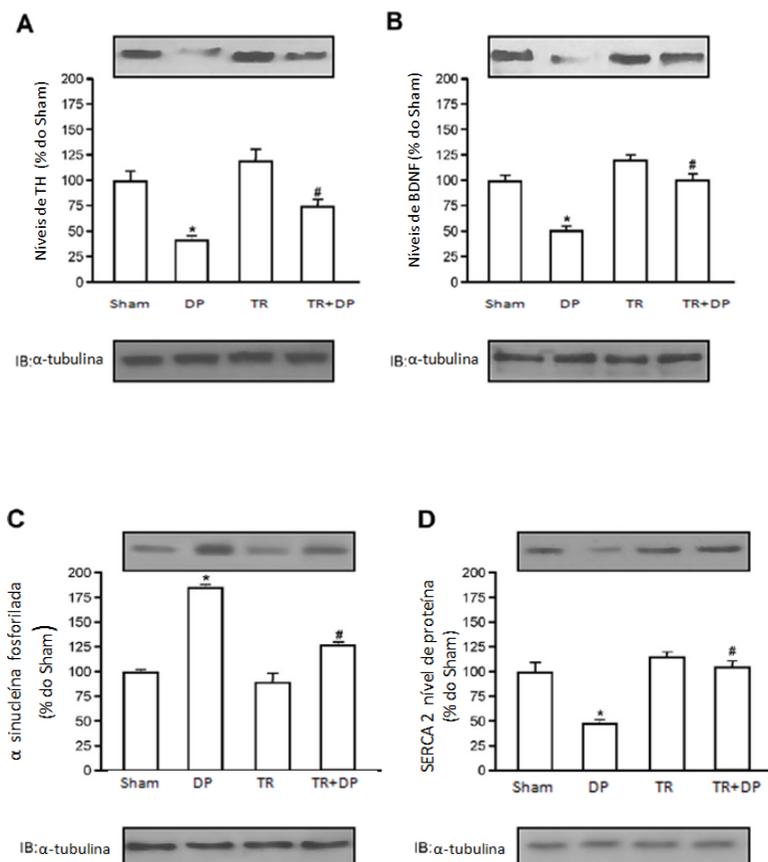


Figura 8. Efeitos do treinamento físico sobre a atividade e expressão da TH (figura 8A), BDNF (figura 8B), α -sinucleína (figura 8C), e SERCA II (figura 8D) no estriado de animais expostos a 6-OHDA. Os níveis de proteínas foram expressos na forma de porcentagem em relação ao grupo sham ($n=3$). A diferença significativa utilizando a relação do grupo sham e TR (*) e em relação a DP (#) foi de $p < 0,05$. Sham = destreinado + sham-operado, DP = destreinado + DP, TR = treinado + sham-operado, e TR+DP = treinado + DP.

4.1.3 Danos oxidativos: Os resultados de TBARS e o conteúdo dos grupos carbonílicos estão apresentados nas Figuras 9A e 9B,

respectivamente. Ambos os marcadores foram aumentados no estriado de animais submetidos a administração de 6-OHDA (TBARS = $0,67 \pm 0,04$ nmol/mg de proteína e grupos carbonilas = $0,68 \pm 0,07$ nmol/mg de proteína) em relação ao grupo controle (TBARS = $0,42 \pm 0,03$ nmol/mg de proteína e carbonil = $0,30 \pm 0,04$ nmol/mg de proteína). Os efeitos do exercício foram semelhantes em ambos os grupos. O grupo TR + DP exibiu um nível menor de TBARS ($0,56 \pm 0,04$ nmol/mg de proteína) grupos carbonilas ($0,27 \pm 0,09$ nmol/MG proteína) do que o grupo DP (TBARS= $0,67 \pm 0,04$ nmol/mg de proteína e de carbonila= $0,68 \pm 0,07$ nmol/mg de proteína).

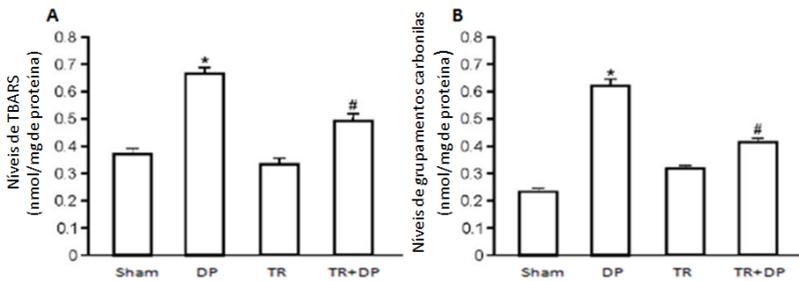


Figura 9. Efeitos do treinamento físico sobre a atividade do TBARS (figura 9A) e níveis dos grupos carbonilas (figura 9B) no estriado de animais expostos a 6-OHDA, foram expressos como média \pm EPM (n=8). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína. A diferença significativa utilizando a relação do grupo Sham e TR (*) e, em relação à DP (#) foi de $p < 0,05$. Sham = destreinado + sham-operado, DP = destreinado + DP, TR = treinado + sham-operado, e TR+DP = treinado + DP.

4.1.4 Enzimas antioxidantes: A figura 10 mostra os níveis de enzimas antioxidantes no estriado. Os animais submetidos a administração de 6-OHDA exibiram um nível mais baixo de SOD (71%) em relação ao grupo Sham, enquanto o grupo TR + DP exibiu um aumento significativo (82%) em comparação com o grupo DP (Figura 10A). Como mostrado na Figura 10B, os valores encontrados nos níveis de CAT foram relativamente semelhantes aos níveis de SOD. O grupo DP mostrou redução de 42 %, nos níveis de CAT em relação ao grupo Sham, enquanto o grupo TR + DP mostrou um nível de 44% maior em comparação com o grupo DP. O nível de GPX não apresentou qualquer alteração significativa entre os grupos (Figura 10C).

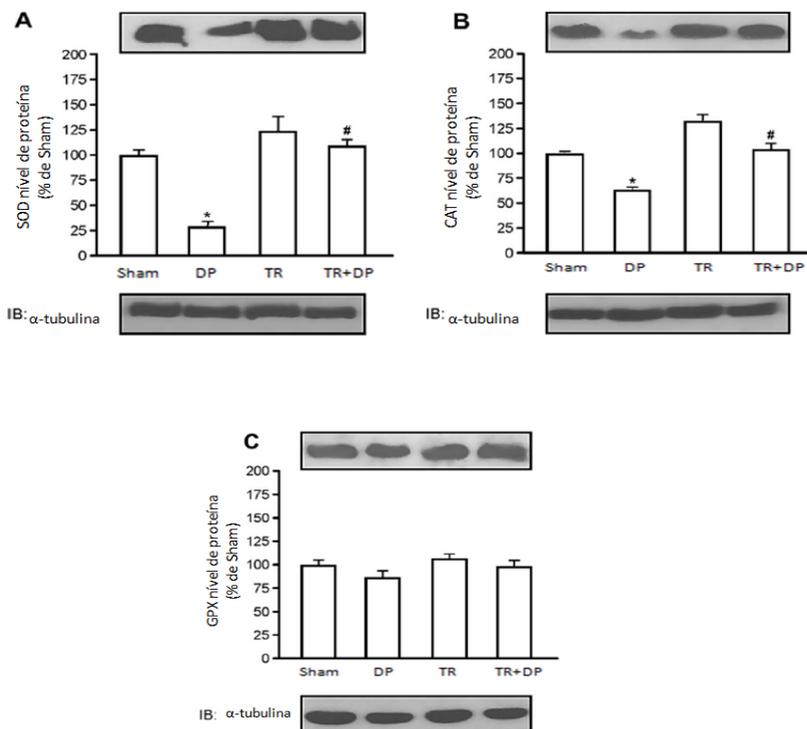


Figura 10. Efeitos do treinamento físico sobre os níveis da SOD (figura 10A), CAT (figura 10B), e GPX (figura 10C) no estriado de animais expostos a 6-OHDA, os níveis de proteína foram expressos com um percentual em relação ao grupo sham (n=3). A diferença significativa utilizando a relação do grupo sham e TR (*) e, em relação a DP (#) era de $p < 0,05$. Sham = destreinado + sham-operado, DP = destreinado + DP, TR = treinado + sham-operado, e TR+DP = treinado + DP.

4.2 EXPERIMENTO 2 e 3

4.2.1 Testes comportamentais: Uma diminuição significativa no número de rotações foi observada no grupo TF + DP ($169,72 \pm 30,4$ voltas/h) e no grupo TE + DP ($8,5 \pm 3,8$ voltas/h) em comparação com o grupo da DP, apesar de não haver diferença significativa entre os dois modelos de exercício (Figura 11A). O grupo Sham ($11,8 \pm 1,4$ voltas/h), os grupos TF ($8,5 \pm 3,8$ voltas/h), e TE ($8,5 \pm 3,8$ voltas/h)

apresentaram menor assimetria rotacional em comparação com animais expostos a 6-OHDA (DP = $102,2 \pm 14,3$ voltas/h; TF + DP = $51,35 \pm 6,38$ voltas/h; TE + DP = $52,39 \pm 7,97$ voltas/h). No teste de nado forçado, não houve diferenças significativas entre os grupos treinados e Sham observados (média de tempo de imobilidade: $245,71 \pm 7.93s$). A análise estatística mostrou um aumento do tempo de imobilidade dos camundongos submetidos a administração de 6-OHDA ($126,25 \pm 14,21s$), em comparação com o grupo Sham, e exercícios de força e corrida ($72,62 \pm 5.13s$ e $75,60 \pm 2.25s$ respectivamente) (Figura 11B). Além disso, no OFT, não houve diferença significativa na atividade locomotora dos animais (Figura 11C, 11D).

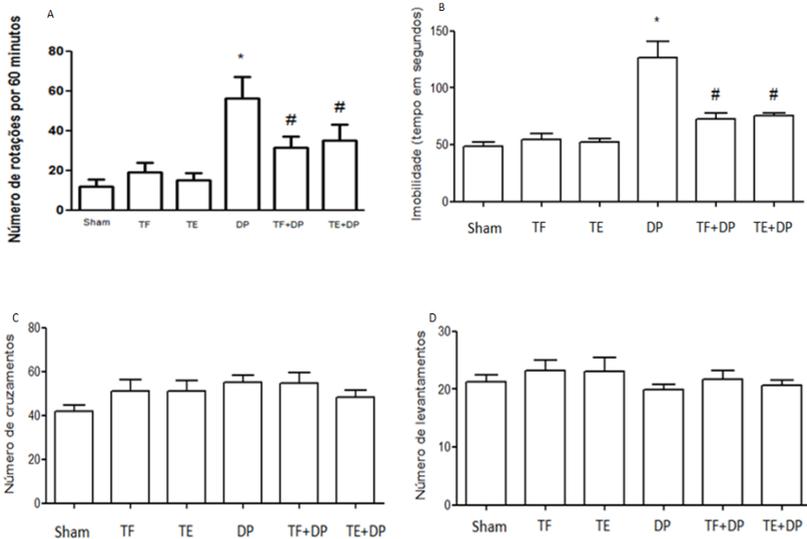


Figura 11. Efeitos de dois protocolos de treinamento físico no teste do rotarômetro (figura 11A), teste de nado forçado (figura 11B) e a atividade locomotora no campo aberto (11C e 11D) nos animais submetidos ao modelo experimental de Parkinson induzido por 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n=12$). * $P < 0,05$ comparado com o grupo Sham, # $p < 0,05$ em relação ao grupo com DP. Sham = destreinado + sham-operado; TF = treinamento de força + operado; TE = treinamento de esteira + operado; DP = destreinado + 6-OHDA; TF + DP = treinamento de força + 6-OHDA; TE + DP = treinamento de esteira + 6-OHDA.

4.2.2 Níveis de pró-BDNF, BDNF e TrkB: Um decréscimo significativo nos níveis de pró-BDNF no estriado (-48,67%) e no hipocampo (-46,24%) foi detectado no grupo da DP em comparação com o grupo Sham. Quando os animais foram ao TF + DP (estriado = 31,47%; hipocampo = 34%) e TE + DP (estriado = 35,67%; hipocampo = 11%) os grupos mostraram um aumento significativo nos parâmetros em relação ao grupo DP (Figura 12A, B). Os valores mostram que os níveis de BDNF são relativamente similares aos níveis de pró-BDNF. Os níveis de BDNF, tanto no estriado e hipocampo foram diminuídos nos grupos DP (estriado= -41,69%; hipocampo= -23,54%) em comparação com o grupo sham, enquanto que os valores na TF + DP (estriado = 23,54%; grupos hipocampo = 46%) e TE + DP (hipocampo = 30,43%) foram aumentados em relação ao grupo DP (Figura 12C e D). Para TrkB, os resultados mostraram que os níveis de TrkB no estriado foram reduzidos em todos os grupos em relação ao grupo Sham (TF = -24,58%, TE = -23,86%, DP = -41,40%, TF+DP = -56,15%, TE+DP = -64%), mas para os animais expostos ao exercício, essa redução também foi observada quando comparado com o grupo DP (TF + DP = -25,18%, TE + DP = -38,57%) (Figura 12E). Os níveis de TrkB no hipocampo também foram reduzidos no TF (-38,17%), TE (-43,84%) e DP (-47,95%) comparados com o grupo sham, e quando os animais foram submetidos aos dois protocolos de treinamento físico, os níveis de TrkB aumentaram significativamente nos grupos TF + DP (38,11%) e TE + DP (63,15%) em comparação com o grupo DP (Figura 12F).

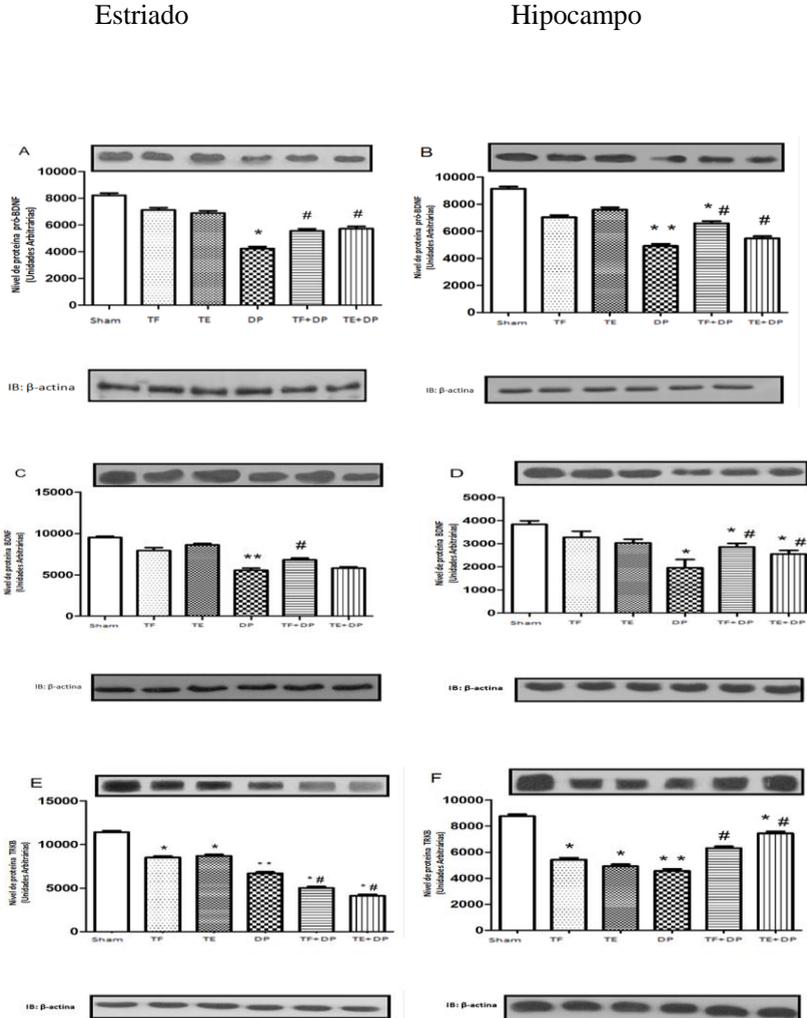


Figura 12. Efeito de dois protocolos de treinamento físico sobre os níveis de pró-BDNF (figura 12A e 12B), BDNF (figura 12C e 12D), TrkB (figura 12E e 12F) no estriado e hipocampo de animais expostos a 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm EPM ($n=3$). * $P < 0,05$ ou ** $p < 0,01$ comparado com o grupo sham, # $p < 0,05$ em relação ao grupo de DP. Sham = destreinado + sham-operado; TF = treinamento de força + operado; TE = treinamento de esteira + operado; DP = destreinado + 6-OHDA; TF + DP = treinamento de força + 6-OHDA; TE + DP = treinamento de esteira + 6-OHDA.

4.2.3 Níveis de TH: Nos níveis de TH, foi observada uma diminuição nos grupos DP, quando comparado com o grupo Sham. No estriado, o grupo TF + DP apresentou um aumento em comparação com o grupo DP, e no hipocampo, foi observado no grupo TE + DP um aumento em comparação com o grupo DP (Figura 13A, 13B).

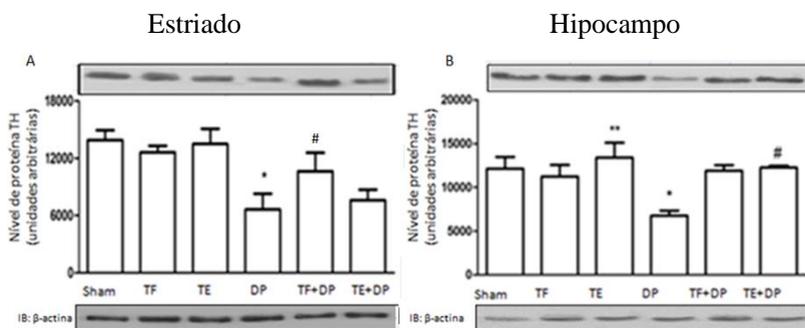


Figura 13. Efeito de dois protocolos de treinamento físico sobre os níveis de TH (figura 13A e 13B) no estriado e hipocampo de animais expostos a 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=3). * P < 0,05 ou ** p < 0,01 comparado com o grupo sham, # p < 0,05 em relação ao grupo de DP. Sham = destreinado + sham-operado; TF = treinamento de força + operado; TE = treinamento de esteira + operado; DP = destreinado + 6-OHDA; TF + DP = treinamento de força + 6-OHDA; TE + DP = treinamento de esteira + 6-OHDA.

4.2.4 Níveis de SIRT-1 e Complexo I: Quanto aos níveis de SIRT-1 no estriado e hipocampo foram observados uma diminuição nos grupos DP em comparação com o grupo Sham, enquanto que os níveis no estriado, no grupo TE + 6-OHDA tiveram um aumento em comparação com o grupo DP (Figura 14A, 14B). No hipocampo foi observado um aumento dos níveis de SIRT-1 nos grupos TF + DP e TE + DP em comparação com o grupo DP. Em relação a a atividade do complexo I, houve uma diminuição significativa no grupo DP em relação ao grupo Sham. No entanto, quando os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento físico, atividade do complexo I foram significativamente aumentados nos grupos TF + DP no estriado e hipocampo (Figura 14C, 14D).

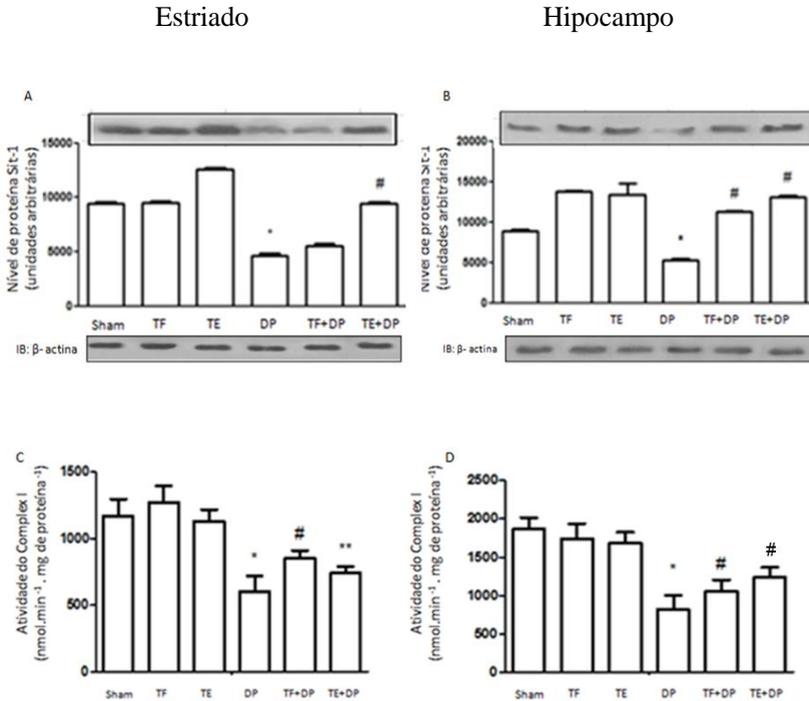


Figura 14. Efeitos de dois protocolos de treinamento físico sobre os níveis de SIRT-1 (figura 14A e 14B) e Complexo I (figura 14C e 14D) no estriado e hipocampo de animais expostos a 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=3). * P <0,05 ou ** p <0,01 comparado com o grupo sham, # p <0,05 em relação ao grupo de DP. Sham = destreinado + sham-operado; TF = treinamento de força + operado; TE = treinamento de esteira + operado; DP = destreinado + 6-OHDA; TF + DP = treinamento de força + 6-OHDA; TE + DP = treinamento de esteira + 6-OHDA.

4.2.5 Níveis de TNF- α , NFK-b e IFN- γ : Os níveis das citocinas pró-inflamatórias, se mostraram elevadas em ambos protocolos de treinamento físico. Nenhuma diferença significativa foi observada nos níveis de TNF- α no estriado em comparação com o grupo sham (Figura 15A). Já os níveis de TNF- α no hipocampo, tiveram um aumento significativo no grupo DP em comparação com o grupo sham, e quando os animais foram submetidos a ambos treinamentos físicos, nos grupos TF + DP e TE + DP mostraram uma diminuição significativa nos níveis

com relação ao grupo DP (Figura 15B). Níveis de NF-kB no estriado e hipocampo foram ambos aumentados nos grupos DP em comparação com o grupo sham, enquanto que os níveis no estriado, nos grupos TF + DP e TE + DP, tiveram uma diminuição significativa em comparação ao grupo DP (Figura 15C). No hipocampo, houve uma diminuição significativa no grupo TF + DP em comparação com o grupo DP (Figura 15D). Níveis de IFN- γ no estriado e hipocampo foram aumentados nos grupos DP em comparação com o grupo sham, no entanto, valores originais no estriado e hipocampo de ambos os grupos TF + DP e TE + DP tiveram uma diminuição em relação ao grupo DP (Figura 15E e 15F).

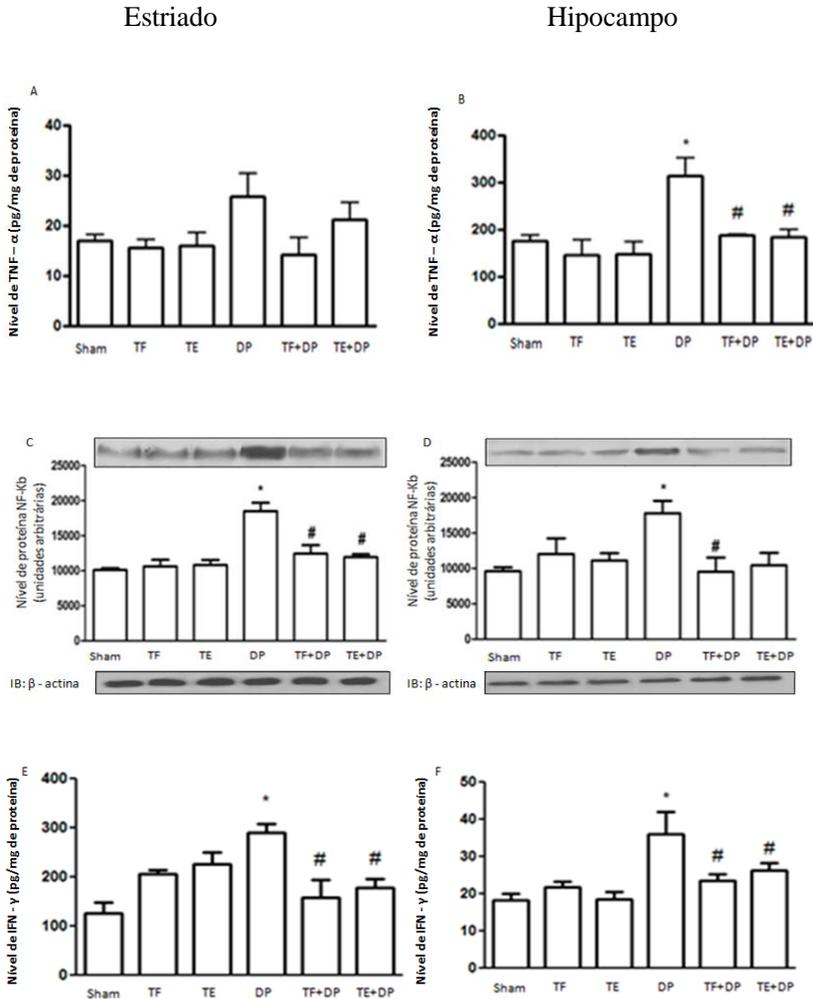


Figura 15. Efeitos de dois protocolos de treinamento físicos sobre os níveis de TNF- α (figura 15A e 15B), NF- κ B (figura 15C e 15D) e IFN- γ (figura 15E e 15F) no estriado e hipocampo de animais expostos a 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=3). * P < 0,05 ou ** p < 0,01 comparado com o grupo sham, # p < 0,05 em relação ao grupo de DP. Sham = destreinado + sham-operado; TF = treinamento de força + operado; TE = treinamento de esteira + operado; DP = destreinado + 6-OHDA; TF + DP = treinamento de força + 6-OHDA; TE + DP = treinamento de esteira + 6-OHDA.

4.2.6 Níveis de IL-17, IL-1 β , TGF- β 1 e NO: Em relação a IL-17 e IL-1 β , os valores mostraram níveis relativamente similares. Os resultados mostraram que os níveis de IL-17, foi aumentada apenas no grupo DP em relação ao grupo sham, no estriado. Não houve diferença significativa em ambos os grupos quando submetidos aos modelos de treinamento físico comparados ao grupo DP (Figura 16A). No entanto, os resultados não mostraram diferença significativa nos níveis de IL-17 no hipocampo (Figura 16B). Níveis de IL-1 β , tanto em estriado quanto no hipocampo, foram aumentados nos grupos DP em comparação com o grupo sham. Quando submetidos ao treinamento físico, os níveis de IL-1 β tiveram uma diminuição significativa nos grupos TF + DP e TE + DP em comparação com o grupo DP no hipocampo (Figura 16C e 16D). Em relação ao TGF- β 1, os resultados não mostraram diferença estatística no estriado (Figura 16E). No hipocampo, os níveis de TGF- β 1 foram aumentados no grupo expostos a 6-OHDA, no grupo DP em comparação ao grupo sham. Quando os animais foram expostos ao treinamento físico, os níveis de TGF- β 1 foram significativamente reduzidos no grupo TF + DP em comparação ao grupo DP (Figura 16F). Os níveis de NO, tanto no estriado e hipocampo, foram aumentados nos grupos DP em comparação com o grupo sham. Quando submetidos ao treinamento físico, nos grupos TF + DP e TE + DP, estes valores, tanto no estriado e hipocampo, tiveram uma diminuição significativa em relação ao grupo DP (Figura 16G e 16H).

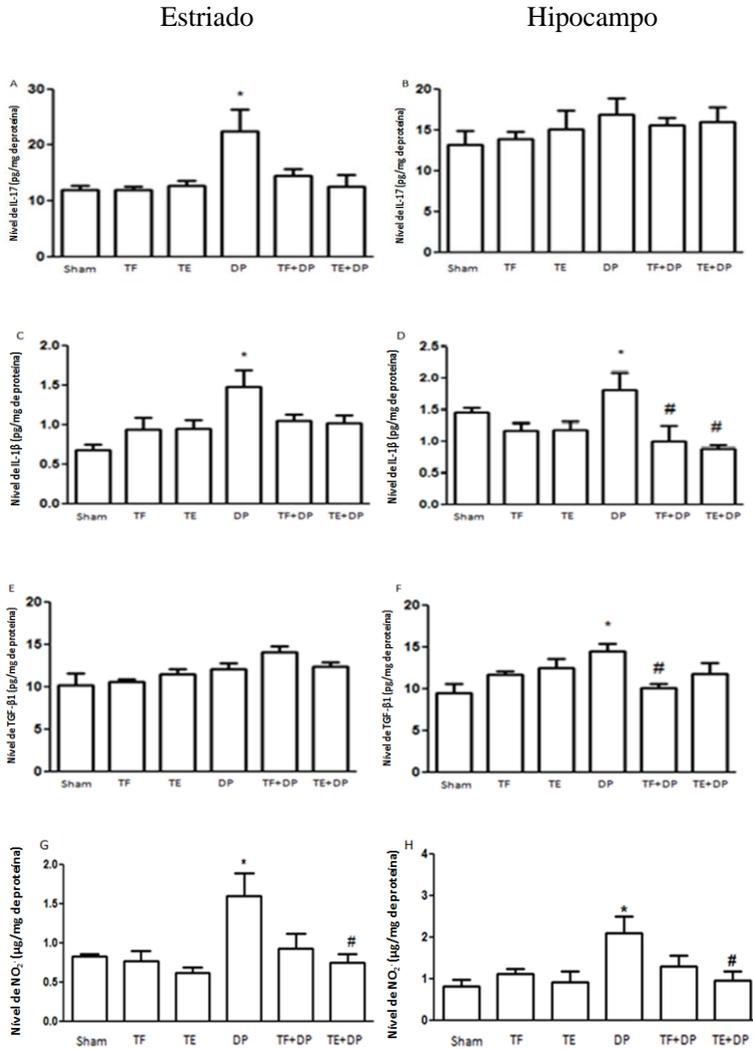


Figura 16. Efeito de dois protocolos de treinamento físico sobre os níveis de IL-17 (figura 16A e 16B) IL-1 β (figura 16C e 16D), TGF- β 1 (figura 16E e 16F) e NO (figura 16G e 16H) no estriado e hipocampo de animais expostos a 6-OHDA. Os valores são expressos como média \pm EPM (n=12). * P < 0,05 comparado com o grupo sham, # p < 0,05 em relação ao grupo de DP. Sham = destreinado + sham-operado; TF = treinamento de força + operado; TE = treinamento de esteira + operado; DP = destreinado + 6-OHDA; TF + DP = treinamento de força + 6-OHDA; TE + DP = treinamento de esteira + 6-OHDA.

5 DISCUSSÃO

5.1 Treinamento físico exerce efeitos neuroprotetores na regulação de fatores neuroquímicos sobre a DP

Vários estudos recentes têm relatado que o exercício físico atenua anormalidades comportamentais e neuroquímica em ratos tratados com 6-OHDA (Tillerson et al., 2003; Yoon et al., 2007; Tajiri et al., 2010). O presente trabalho demonstrou claramente que o exercício físico exerce um efeito protetor contra o estresse oxidativo cerebral, bem como, modula, significativamente a atividade da TH, da α -sinucleína e do conteúdo de BDNF e SERCA II no estriado de ratos com a DP.

O teste de rotarômetro é um parâmetro útil para avaliar os desequilíbrios da dopamina no modelo experimental hemiparkinsoniano. Os resultados obtidos mostram um aumento no número de voltas dos animais com a DP, mas com a exposição prévia ao exercício, os animais apresentaram rotações semelhantes ao grupo controle. Resultados similares foram relatados por outros estudos (Yoon et al, 2007; Jin et al., 2008), e os autores sugeriram que esta resposta ao exercício reflete um efeito protetor sobre os neurônios dopaminérgicos do corpo estriado de ratos, em particular na produção de dopamina. Este resultado é reforçado pela resposta positiva nos níveis de TH observado no grupo exercício. A 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 deficiência da TH está associado com o desenvolvimento da DP, e isto pode ser inicialmente limitada por uma distonia do membro unilateral ou assimetria, tremor postural, afetando a coordenação motora e função cerebral. Os resultados mostram que o treinamento físico protege o estriado contra os efeitos da 6-OHDA nos níveis de TH e corrobora outros estudos recentes que usaram o exercício físico como forma de tratamento, embora tanto o volume e intensidade do treinamento nesses estudos foram diferentes. Yoon e colaboradores (2007) 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 6-OHDA foi suficiente para aumentar os níveis de TH. Em outro estudo, Tajiri e colegas (2010) também usaram o treinamento em esteira e corrida durante 30 minutos, uma vez por dia, durante 4 semanas, o que mostrou preservação significativa de fibras TH-positivas no estriado e em neurônios da SNpc. Ambos os estudos sugerem que o treinamento físico proporciona uma resposta terapêutica para o tratamento da DP,

enquanto o presente estudo sugeriu que o treinamento físico exerce efeitos preventivos sobre a DP.

O aumento nos níveis de α -sinucleína e a diminuição dos níveis de SERCA II em animais com a DP foram significativamente alterados pelo exercício. A α -sinucleína é uma proteína que tem especial relevância para a compreensão da DP uma vez que a formação intracelular de agregação da α -sinucleína contribui para a toxicidade do cérebro (Gao et al., 2007). É possível que a diminuição dos níveis de TH podem também estar associados com o aumento observado nos nível de α -sinucleína, devido a facilidade de interação com a TH, reduzindo assim a sua fosforilação (Peng et al., 2005). A agregação anormal da α -sinucleína pode levar a uma desregulação de Ca^{2+} , provavelmente através da redução de SERCA II, como observado no presente estudo, o que aumenta do Ca^{2+} citosólico, a produção de ERO e a ativação de proteases dependentes de cálcio. A calpaína, uma importante protease que ativa o Ca^{2+} , pode clivar a α -sinucleína, produzindo estruturas mais suscetíveis a agregação, o que favorece a formação de protofibrilas (Danzer et al., 2007). Este fenômeno leva a uma sobrecarga de Ca^{2+} , mudança de transição e de permeabilidade mitocondrial e concomitante morte celular neuronal (Dufty et al., 2007.; Oakley et al., 2007). O mecanismo pelo qual o exercício físico interage com a α -sinucleína e SERCA II não é completamente compreendido. No entanto, o estresse oxidativo tem sido relacionado com os níveis de α -sinucleína (Cookson, 2009), bem como, à redução de SERCA II pela glutatilação (Vangheluwe et al., 2005). Assim, é possível que os efeitos do exercício sejam indiretas, onde a redução dos níveis de estresse oxidativo contribui para a manutenção dos níveis baixos de α -sinucleína agregada e SERCA II.

Existe uma consistente literatura indicando que os programas de treinamento envolvendo exercícios de leve e a moderada intensidade, regulam a expressão e os níveis de neuroproteínas, como o BDNF, em diferentes áreas do cérebro de roedores, tais como o hipocampo (Berchtold et al., 2005; Ploughman et al., 2007; Aguiar et al., 2011) e estriado (Engesser-Cesar et al., 2007; Aguiar et al., 2008). No entanto, os efeitos neuroprotetores do exercício contra a redução de fatores neurotróficos induzidos por 6-OHDA tem sido pouco investigado. Os resultados dos níveis de BDNF são semelhantes aos resultados da TH, isto é, os animais expostos a injeção 6-OHDA mostraram um nível mais baixo de BDNF, mas quando expostos ao exercício, os níveis de BDNF se mantiveram iguais aos níveis de controle. Estes resultados podem ajudar na compreensão dos efeitos preventivos do exercício físico sobre

o nível de TH, pois, de acordo com Fukuchi e colaboradores (2010), a transcrição do gene *TH* é positivamente regulada pelo BDNF. Usando 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina para induzir a DP nos animais, Lau e colaboradores (2011) examinaram as conseqüências neurológicas, comportamentais e fisiológicas do exercício de endurance. A longo prazo, os resultados reforçam nossos resultados, indicando que o exercício aumenta os níveis de BDNF nigroestriatal, produção neuronal e proteção mitocondrial nos ratos parkinsonianos crônicos com neurodegeneração.

Os níveis de BDNF são altamente influenciados por mudança no estado cerebral redox (Siamilis et al., 2009). Um desequilíbrio na produção ou na remoção de ERO pode causar estresse oxidativo e reduzir os níveis de BDNF e TH. De acordo com Wu e colaboradores (2004), os mecanismos pelos quais o estresse oxidativo reduz estas proteínas são complexos, e vários fatores podem estar envolvidos na diminuição da atividade da proteína-1 e CREB, e depleção de energia e, em seguida, o comprometimento da função de NMDA. É possível que a redução do estresse oxidativo, restaure o estado redox e isso pode resultar na manutenção da função dos receptores NMDA (Lu et al., 2001; Bustos et al., 2009), aumentando os níveis de BDNF e TH (Fukuchi et al., 2010).

O cérebro é considerado altamente sensível ao dano oxidativo, pois possui níveis elevados de fosfolipídios e ácidos graxos poliinsaturados livres, os quais são altamente suscetíveis a oxidantes, além de possuir um alto consumo de oxigênio e baixos níveis de enzimas antioxidantes (Jenner, 2003). Adicionalmente, certas regiões, como o estriado, têm altos níveis de ferro, os quais facilitam a produção de ERO (Sian-Hülsmann et al., 2011). Por outro lado, várias formas terapêuticas têm sido utilizadas para reduzir o estresse oxidativo no cérebro. O exercício físico é conhecido por aumentar os níveis do sistema antioxidante cerebral e regular os níveis do dano oxidativo (Um et al., 2008.; Aguiar et al., 2008, 2010, 2011; Tuon et al., 2010), mas esta resposta depende do tipo de exercício utilizado. Aguiar e colaboradores (2010, 2011) relataram que o exercício de alta intensidade pode aumentar o dano oxidativo no cérebro, mas o exercício de baixa intensidade promove neuroproteção. 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 e Gutteridge, 2007). Portanto, a manutenção da função cerebral depende do equilíbrio entre os sistemas antioxidantes e pró-oxidantes (Zhou et al., 2008). Os resultados do conteúdo da SOD e

CAT, no presente estudo, mostram que, os animais expostos ao exercício apresentam níveis semelhantes em relação ao grupo controle, embora os níveis de GPX não foram alterados pela injeção de 6-OHDA como foram pela indução do exercício físico. É possível que este fato decorra da baixa densidade de células contendo GPX, nos neurônios estriatais, os quais também deixam o cérebro mais susceptível ao dano oxidativo.

Em resumo, os resultados sugerem que o exercício físico exerce um efeito protetor no modelo animal de DP induzido por 6-OHDA, uma vez que ele modula o estado redox cerebral e preserva o conteúdo de proteínas, importantes para a função cerebral fisiológica.

5.2 Treinamento físico previne comportamento tipo depressivo e diminui o fator neurotrófico derivado do cérebro em animais submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA

A depressão é um transtorno psiquiátrico freqüentemente associado à DP, e se caracteriza como um sintoma secundário à progressão da neurodegeneração. Embora ambos os transtornos tenham etiologias distintas, a DP pode estar associada à depressão (Mc Donald et al., 2003). O estriado e o hipocampo são duas estruturas cerebrais que demonstram alterações neuroquímicas induzidas por ambos os transtornos (Martínez- Martín e Damião, 2010), mas também respondem positivamente aos efeitos neuroprotetores do exercício (Aguiar et al., 2008; Marais et al., 2009; Tuon et al., 2010; Ke et al., 2011; Tuon et al., 2012).

Vários estudos recentes têm demonstrado que o exercício físico atenua transtornos cognitivos e comportamentais, bem como anormalidades neurobiológicas, em ratos expostos à 6-OHDA (Reijnders et al., 2008; Tajiri et al., 2010; Vai et al., 2014; Landers et al., 2013). No entanto, o efeito do exercício sobre o cérebro está diretamente associado às características do exercício, incluindo a intensidade, freqüência, duração e tipo de exercício (Aguiar et al., 2007).

Mudanças comportamentais na DP, depressão e outros distúrbios neurológicos foram demonstrados em diversos estudos e diferentes modelos experimentais (Teo et al, 2014; Uemura et al., 2013). No entanto, o mecanismo exato da depressão induzida por 6-OHDA ainda está sujeito a investigação. Alguns estudos (Aarsland et al., 2011; Santiago et al., 2014) encontraram os mecanismos que sustentam a depressão na DP, relacionadas as mudanças nos níveis de

neurotransmissores (norepinefrina, DA e 5-HT), que estão associados com regulação do humor. O entendimento atual é que, uma vez dentro dos neurônios dopaminérgicos, a 6-OHDA inicia a degeneração diminuindo esses neurotransmissores (Carvalho et al., 2013). Além disso, a 6-OHDA acumula-se no citosol e sofre rápida auto-oxidação. Isto promove uma alta taxa de formação de ERO, principalmente, peróxido de hidrogênio, que está diretamente associado com a depressão, devido a sua capacidade de oxidar neurotransmissores, bem como neurotrofinas (Maes et al., 2011).

Embora não haja uma correlação direta entre depressão e deficiência motora, Cummings (1992) e Reijnders et al. (2008) sugeriram que os sintomas associados à DP, em particular os sintomas motores, tais como a acinesia, podem obscurecer o diagnóstico da depressão, apatia ou ansiedade. Assim, o diagnóstico e o tratamento da depressão parecem evidentes e necessários para o tratamento da DP. Os resultados obtidos no teste de nado forçado mostraram que a administração de 6-OHDA induziu aumento do tempo de imobilidade, e a exposição dos animais ao treinamento de corrida e força, promoveu reversão deste efeito.

Em geral, os efeitos do exercício para reduzir os efeitos tipo depressivos estão associados a uma resposta neuroquímica positiva ao treinamento físico, observado no presente estudo. Marais et al. (2009) e Liu et al. (2013) também observaram redução do comportamento tipo depressivo usando um modelo de exercício alternativo, e os autores sugerem que o mecanismo pelo qual o comportamento tipo depressivo foi revertido com o exercício, pode ter sido mediado através do aumento dos níveis de neurotrofinas no estriado e hipocampo. Isso levaria a um aumento da neuroplasticidade (neurogênese, ramificação axonal, gênese dendrítica e sinaptogênese) e prevenção da morte neuronal. Este processo pode ser um fator central na fisiopatologia da depressão (Masi e Brovedani, 2011) e está possivelmente associada à DP.

O BDNF tem sido reconhecido como um regulador, com papel chave, no desenvolvimento da sinapse e plasticidade e tem, portanto, atraído o interesse na compreensão de várias doenças neurodegenerativas e psiquiátricas. Especificamente, estudos pré-clínicos mostraram correlações entre os comportamentos tipo depressivos, como induzida pelo estresse, e diminuição dos níveis de BDNF no hipocampo, bem como o tratamento com antidepressivos, favorece a expressão de BDNF (Martinowich et al., 2007). Resultados semelhantes foram mostrados na DP (Rangasamy et al., 2010). Em modelos experimentais, os níveis de BDNF e outras neurotrofinas estão

diminuídos após a exposição a toxinas tais como MTPT no estriado (Tripanichkul et al., 2010) e no hipocampo (Lesemann et al., 2012) e 6-OHDA, em camundongos e ratos (Marais et al., 2009; Tuon et al., 2012). Contudo, o exercício leva a regulação positiva dos fatores neurotróficos em regiões do SNC, que regulam a sobrevivência neuronal, diferenciação e plasticidade sináptica (Aguiar et al., 2011; Tuon et al., 2012).

Considerando a reversão dos baixos níveis de BDNF induzidos pela 6-OHDA, os dois modelos de treinamento mostraram ser eficazes no aumento dos níveis de pró-BDNF e TrkB no hipocampo e o estriado. O BDNF é inicialmente sintetizado por um precursor (pró-BDNF), depois é clivado para produzir o BDNF maduro (mBDNF). O pró-BDNF interage preferencialmente com o receptor pan-neurotrofina p75 (p75NTR), enquanto mBDNF liga-se seletivamente ao receptor tirosina quinase B (TrkB). Este receptor tirosina quinase, controla uma cascata de sinalização intracelular, promovendo a sobrevivência celular (Je et al., 2012). Por outro lado, os efeitos pró-apoptoses do pró-BDNF tem sido sugerido ou demonstrado em vários estudos (Lu et al., 2005; Teng et al., 2005; Woo et al., 2005; Hoshimizu et al., 2009) por meio da identificação das pró-neurotrofinas como ligantes endógenos para indução de morte, que são secretadas e iniciam a morte celular programada, através da ativação de p75NTR. Hoshimizu e colaboradores (2009) sugerem que a clivagem do pró-BDNF é um passo crucial para a regulação negativa de ações neurotróficas no cérebro, porém pouco se sabe sobre a função do pró-BDNF, quando comparado com os numerosos relatos sobre os mecanismos de ação do BDNF maduro (mBDNF) (Lu et al., 2005). Além disso, a presença ou ausência de sortilina em uma célula, uma proteína transmembranar do tipo I, determina ou não as funções p75NTR como um receptor de morte celular (Teng et al., 2005). Investiga-se, se os efeitos do pró-BDNF são mais susceptíveis a serem associados com a maturação do BDNF e também com os efeitos pró-apoptóticos. Os resultados do presente estudo demonstraram mudanças positivas nos padrões comportamentais que são possivelmente dependentes da ação desta neurotrofina (Drzyzga et al., 2009). Assim, na presença de morte celular por apoptose, é estimulado por níveis significativos de pró-BDNF, as consequências sobre os parâmetros avaliados também seriam representados negativamente nos dados comportamentais. Portanto, em estudos futuros, seria importante estabelecer, em que circunstâncias na DP, tem ação de sobrevivência pró-neurotrófica ou efeitos de apoptose.

A neurotrofina BDNF e o receptor de neurotrofina TrkB, mostraram níveis reduzidos no cérebro dos animais expostos a 6-OHDA, mas a redução do pró-BDNF e BDNF foram significativamente menores nos animais previamente submetidos ao treinamento físico. De acordo com Costa e colaboradores (2012), ratos submetidos ao treinamento de corrida em uma intensidade moderada, mostrando aumento nos níveis de BDNF induzidos pelo exercício podem estar contribuindo para a baixa regulação dos receptores TrkB, resultando na disfunção de TrkB ou nos seus componentes da via de sinalização (Chen e Weber, 2004; Tsai et al., 2004). Além disso, os resultados podem ser associados com o funcionamento de neurotrofinas específicas no cérebro. Por exemplo, a ativação de TrkB desempenha um papel crucial na fase inicial da potenciação de longo-prazo em processos depressivos, via ativação de p75NTR (Woo et al., 2005; Martinowich et al., 2007).

Em conclusão, uma melhoria no estado neuroquímico, pode estar relacionada com uma melhor força muscular e capacidade física induzida por ambos os modelos de treinamento físico, bem como por atenuar a progressão da DP. Sendo assim, acredita-se que a intensidade do esforço envolvido é o fator mais importante a ser considerado na prescrição de exercício e deve ser investigado em estudos futuros.

5.3 Treinamento físico regula parâmetros da função mitocondrial e mecanismo de neuroinflamação em animais submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA

O estudo foi desenhado para investigar os efeitos de dois diferentes protocolos de treinamento físico (treinamento aeróbio em esteira e treinamento de força), sobre marcadores da função mitocondrial e mecanismos regulatórios da neuroinflamação no estriado e hipocampo de camundongos submetidos a um modelo animal de DP induzido por 6-OHDA. O estriado e o hipocampo são duas estruturas cerebrais que respondem positivamente aos efeitos neuroprotetores do exercício, particularmente sobre a função mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação cerebral (Aguiar et al., 2008; Marais et al., 2009, Tuon et al., 2010; Ke et al, 2011; Tuon et al., 2012)

A eficiência do modelo utilizado foi determinada a partir dos níveis de TH (hipocampo e estriado) e do teste rotacional. Ambos marcadores têm sido utilizados como indicadores de neurodegeneração induzido por 6-OHDA (Mokry, 1995; Haavik e Toska de 1998; Cunha et al., 2008; Barbieiro et al., 2014). Similarmente aos resultados obtidos no experimento I, a redução no número de voltas realizadas pelos ratos

com DP no teste de rotarômetro e consequente resposta positiva ao treinamento físico também foram observadas em camundongos. Da mesma forma, sob as mesmas condições experimentais, a deficiência de TH no estriado de ratos expostos a 6-OHDA, observadas no experimento I, apresentaram resultados similares no estriado e hipocampo de camundongos. Contudo, ambas as estruturas apresentaram níveis próximos ao controle quando os animais foram previamente submetidos aos programas de treinamento em esteira e de força. Resultados similares têm sido observados em outros estudos que utilizaram volumes de treinamentos variados, mas intensidades similares (Yoon et al., 2007; Jin et al., 2008; Tajiri et al., 2010). Tomados em conjunto, estes estudos sugerem que o treinamento físico, independente do modelo utilizado, contribui para a prevenção e tratamento da DP em modelos experimentais. Diversos fatores são descritos pelos estudos como os principais mediadores que promovem neuroproteção a partir do exercício físico na DP, dentre os quais as alterações dos fatores neurotróficos parecem ser mais evidentes (Aguiar et al., 2008; Radak et al., 2008; Tajiri et al., 2010). Entretanto, de acordo com Ciucci et al. (2008) mecanismos subjacentes induzidos pelo treinamento físico e observados em modelos experimentais, o que inclui uma melhora funcional dos neurônios que sobrevivem à exposição de 6-OHDA e ativação da neurogênese endógena, são também responsáveis pelos índices de neuroproteção.

Adicionalmente, outros fatores da regulação neuronal também têm contribuído para os resultados neuroprotetores do treinamento físico observados na DP dentre os quais a função mitocondrial e na regulação de proteínas envolvidas na neuroinflamação serão destacadas nesse estudo.

Diversos estudos experimentais tem mostrado o papel da disfunção mitocondrial na DP, particularmente resultante da redução na atividade do complexo I mitocondrial (Blandini e Armentero, 2013), bem como, alterando o conteúdo e atividade de proteínas do estado redox celular (Ramadori et al., 2008; Wareski et al., 2009; Bayod et al., 2011). Os resultados do presente trabalho mostraram uma diminuição na atividade do complexo I e no conteúdo da SIRT-1 nos animais com a DP com significativa elevação desses níveis, tanto no hipocampo, quanto no estriado, quando previamente expostos a ambos os modelos de treinamento. O complexo I é um importante componente da Cadeia Transportadora de Elétrons e se constitui por um conjunto de moléculas funcionais com a capacidade de translocar prótons através da membrana interna a partir da relação NAD^+/NADH para promover a síntese

oxidativa de ATP (Acín-Perez et al., 2008). O comprometimento desse complexo é evidenciado em modelos experimentais com 6-OHDA (Blandini e Armentero, 2013) o que torna as células dependentes de ATP mais vulneráveis à apoptose e contribui para a produção de ERO, que em conjunto, levam a morte e à disfunção das células durante o processo de desenvolvimento da DP (Henchcliffe e Beal, 2008). Os efeitos do exercício sobre os complexos da cadeia respiratória cerebral, em particular sobre o complexo I, resultam possivelmente das mudanças em proteínas regulatórias da função mitocondrial. A SIRT-1, por exemplo, é uma proteína que regula processos metabólicos em diferentes tecidos e tem sido associada a mecanismos de neuroproteção (Quin et al., 2006; Ramadori et al., 2008) por estar envolvida no processo regulatório dependente da NAD^+/NADH a partir da desacetilação de outras proteínas, como HSF1, do inglês Heatshockfactorprotein 1 (Donmenz et al., 2012), NF- κ B (Yeung et al., 2004, Yang et al., 2010) e PGC-1 α , do inglês Peroxisomeproliferator-activated receptor gammacoactivator 1-alpha (Sack e Finkel, 2012), que alteram o estado redox cerebral e adicionalmente, reduzem a agregação de alfa-sinucleína (Donmenz et al., 2012). Portanto, mudanças no complexo I observados em nosso estudo podem contribuir para uma redução na relação de NAD^+/NADH e, por conseguinte, elevar de forma compensatória e regulatória os níveis de SIRT-1, a partir de estímulos endógenos ou pelo treinamento físico, provavelmente dependente da ativação da PGC1-alfa (Wareski et al., 2009, Ji et al., 2010, Sack e Finkel, 2012).

A neuroinflamação possui significativa importância na patogênese da DP (Hirsch et al., 2012) tendo o NF- κ B um papel regulatório importante nesse processo (Mogi et al., 2007). O NF- κ B é encontrado no núcleo dos neurônios, células gliais e em diversas regiões da SNpc que controla a expressão de vários genes envolvidos na inflamação e na resposta imune do cérebro (Mattson e Meffert, 2006). Terapias que visam inibir a expressão de NF- κ B pode ser bem sucedida em prevenir ou retardar a progressão da DP. Entretanto, os fatores que determinam se a ativação do NF- κ B é benéfico ou prejudicial aos neurônios na DP são ainda inconclusivos. Isso porque estudos com modelos animais com DP sugerem também um papel neuroprotetor do NF- κ B dado sua capacidade de regular genes envolvidos na produção de radicais livres e na função mitocondrial. Por exemplo, o tratamento de ratos com um inibidor da NF- κ B, aumenta a vulnerabilidade das células dopaminérgicas à presença de 6-OHDA (Park et al., 2004). Por outro lado, a ativação de NF- κ B, em desordens neurodegenerativas também

têm sido implicados na morte de neurônios em condições de elevado estresse oxidativo e capacidade metabólica reduzida (Mattson e Meffert, 2006; Peterson e Flood, 2012).

Os resultados observados no presente estudo mostram que o hipocampo e estriado de animais expostos à 6-OHDA apresentaram níveis elevados de NF- κ B com redução significativa quando os animais foram previamente submetidos tanto ao treinamento em esteira quanto ao treinamento de força. Portanto, considerando nesse estudo a ativação do NF- κ B como um mediador das respostas neuroinflamatórias induzidas por 6-OHDA, a redução dos níveis observados nos grupos com treinamento físico sugere um mecanismo de neuroproteção regulado pelo NF- κ B. Um dos possíveis mecanismos que pode promover essa regulação a partir NF- κ B pode estar associado com o aumento nos níveis de SIRT-1, também observados no presente estudo. Yeung et al. (2004) e Yang et al., (2012) citam que SIRT-1 pode desacetilar p65 NF- κ B levando a supressão consequente de interleucinas pró-inflamatórias. Outros estudos também têm demonstrado efeito inibitório da inflamação mediado pela SIRT-1. Por exemplo, Chen e colaboradores (2005) demonstraram que a superexpressão de SIRT-1 ou ativação pelo resveratrol promove desacetilação da p65 bem como a supressão da ativação transcricional pelo NF- κ B, resultando na proteção contra toxicidade neuronal. Esse processo possivelmente justifica as respostas obtidas nos níveis de proteínas pró-inflamatórias observadas nesse estudo, dado que o NF- κ B controla a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias.

Similarmente aos resultados obtidos no presente estudo, os elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17 e TGF- β têm sido também associadas com a DP (Garcia-Esparcia et al., 2014) e induzem danos neuronais através de uma variedade de mecanismos, incluindo a produção de ERO (Koprach et al., 2008). De acordo com Orr e colaboradores (2002), essas citocinas junto com fatores liberados por células dopaminérgicas parecem ampliar e sustentar a neuroinflamação, como também, as respostas imunes que conduzem a destruição irreversível dos neurônios dopaminérgicos do SNC. Sob condições fisiológicas, estas citocinas são expressas em níveis baixos no hipocampo e estriado, mas podem ser induzidas a elevados níveis por estímulos resultantes da neurodegeneração resultando numa complexa cascata de eventos neurotóxicos levando a propagação das reações inflamatórias (Zhao et al., 2007; Koprach et al., 2008).

Além do NF- κ B, a produção aumentada de óxido nítrico pode ser um outro provável mecanismo responsável pelos elevados níveis de

citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e estriado dos animais com DP. Essa observação se deve ao fato de que células gliais podem gerar óxido nítrico em níveis neurotóxicos em função dos elevados níveis de IFN- γ (Chao et al., 1992; Barcia et al., 2011), que ao ser liberado pela microglia induz a expressão de CD-23 (Hunot et al., 1999; Członkowska et al., 2002). A CD-23 é uma glicoproteína que quando ativada promove a produção de óxido nítrico sintase (Dugas et al., 2001) com concomitante produção de nitratos que podem mediar a síntese de citocinas. Desta forma, os efeitos do exercício sobre os mediadores inflamatórios poderiam estar diretamente associados à regulação na síntese do óxido nítrico, contribuindo para redução de proteínas pró-inflamatórias. Estudos prévios têm mostrado que o treinamento físico em esteira reduz os níveis de óxido nítrico sintase neuronal e induzível em modelos experimentais de DP em estriado e hipocampo por reduzir a atividade da microglia (Sung et al., 2012; Al-Jarrah et al., 2013). Portanto, tomados em conjunto, esses resultados podem justificar, pelo menos em parte, as implicações positivas dos modelos de treinamento físico utilizados nesse estudo sobre a patogenicidade cerebral da DP induzida por 6-OHDA.

Em resumo, embora o hipocampo e o estriado apresentem susceptibilidade diferenciada à 6-OHDA, particularmente IL-17 e TGF- β , o que deve ser melhor investigado, ambas as estruturas respondem similarmente de forma independente aos modelos de treinamento físico utilizados nesse estudo. Tanto o treinamento em esteira quanto o treinamento de força promovem neuroproteção possivelmente por estimular a atividade da Sirt-1 e com isso regular tanto a função mitocondrial bem como a neuroinflamação pela desacetilação do NF- κ B. Adicionalmente, os efeitos do treinamento sobre os níveis de óxido nítrico também parece ser um dos mecanismos responsáveis pelo controle da inflamação induzida pela 6-OHDA.

6 CONCLUSÕES

Em resumo, a redução da produção de oxidantes com aumento do sistema enzimático de defesa antioxidante é um dos mecanismos em que o treinamento físico exerceu efeitos positivos no estriado de ratos bem como a atividade. Adicionalmente, mudanças comportamentais e regulação de neurotrofinas também foram moduladas pelo treinamento os quais promoveram uma redução nos sintomas tipo depressivos apresentados pela doença. Por fim, ambos os modelos de treinamento, força e em esteira, promoveram neuroproteção por regular tanto a função mitocondrial bem como a neuroinflamação a partir da desacetilação do NF- κ B via Sirt-1 e redução nos níveis óxido nítrico. Tomados em conjunto, os resultados obtidos sugerem que o treinamento físico, independente dos modelos utilizado, mas sob as condições de intensidade, volume e duração estabelecidas nesse estudo, exerce um efeito neuroprotetor no hipocampo e estriado de roedores submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA. Possivelmente, em termos gerais, esses resultados decorrem da capacidade que o treinamento físico demonstrou em modular o estado redox cerebral e preservar o conteúdo de proteínas neurotróficas com conseqüente modulação dos parâmetros inflamatórios, as quais são importantes para a manutenção da função cerebral normal.

8 REFERÊNCIAS

Aarsland D, Pålhlagen S, Ballard CG, Ehrt U, Svenningsson P. Depression in Parkinson disease--epidemiology, mechanisms and management. *Nat Rev Neurol*. 2011; 8(1):35-47.

Aan het Rot M, Collins KA, Fitterling HL. Physical exercise and depression. *Mt Sinai J Med*. 2009; 76(2):204-14.

Abdin AA, Sarhan NI. Intervention of mitochondrial dysfunction-oxidative stress-dependent apoptosis as a possible neuroprotective mechanism of α -lipoic acid against rotenone-induced parkinsonism and L-dopa toxicity. *Neurosci Res*. 2011; 71(4):387-95.

Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato ML, Pérez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell*. 2008; 32(4):529-39.

Aguiar AS Jr, Tuon T, Albuquerque MM, Rocha GS, Speck AE, Araújo JC, Dafré AL, Prediger RD, Pinho RA. 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*. 2008; 115(12):1643-50.

Aguiar AS JR, Tuon T, Pinho CA, Silva LA, Andreazza AC, Kapczinski F, Quevedo J, Streck EL, Pinho RA. Intense Exercise Induces Mitochondrial Dysfunction in Mice Brain. *Neurochem Res*. 2008; 33:51-8.

Aguiar AS Jr, Tuon T, Pinho CA, Silva LA, Andreazza AC, Kapczinski F, Quevedo J, Streck EL, Pinho RA. Mitochondrial IV complex and brain neurotrophic derived factor responses of mice brain cortex after downhill training. *Neurosci Lett*. 2007; 22:171-4.

Aguiar AS Jr, Tuon T, Soares FS, da Rocha LG, Silveira PC, Pinho RA. The effect of n-acetylcysteine and deferoxamine on exercise-induced oxidative damage in striatum and hippocampus of mice. *Neurochem Res*. 2008; 33:729-36.

Aguiar AS Jr, Castro AA, Moreira EL, Glaser V, Santos AR, Tasca CI, Latini A, Prediger RD. 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.* 2011; 132:560-7.

Aguiar AS, Boemer G, Rial D, Cordova FM, Mancini G, Walz R, De Bem AF, Latini A, Leal RB, Pinho RA, Prediger RD. High intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice. Involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. *Neuroscience.* 2010; 29:1216–27.

Aguiar Jr AS, Speck AE, Prediger RD, Kapczinski F, Pinho RA: Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. *J Neural Transm.* 2008; 115:1251–5.

Aleixo LC, Moreno SR, Freitas Rde S, Thomaz H, Santos-Filho SD, Bernardo-Filho M. Ginkgo biloba extract alters the binding of the sodium [123I] iodide (Na123I) on blood constituents. *Appl Radiat Isot.* 2012; 70(1):59-62.

Alexi T, Borlongan CV, Faull RL, Williams CE, Clark RG, Gluckman PD, Hughes PE. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol.* 2000; 60(5):409-70.

Al-Jarrah M, Obaidat H, Bataineh Z, Walton L, Al-Khateeb A. Endurance exercise training protects against the upregulation of nitric oxide in the striatum of MPTP/probenecid mouse model of Parkinson's disease. *Neuro Rehabilitation.* 2013; 32(1):141-7.

Arcoverde C, Deslandes A, Rangel A, Rangel A, Pavão R, Nigri F, Engelhardt E, Laks J. Role of physical activity on the maintenance of cognition and activities of daily living in elderly with Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr.* 2008; 66:323-7.

Arruda WO, Meneses MS. Fisiologia dos Núcleos da Base e Estruturas Correlatas. In: Teive, HAG; Meneses, MS. *Doença de Parkinson.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2003; 55:5-7.

Baillet A, Chantepedrix V, Trocme´ C, Casez P, Garrel C, Besson G: The role of oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2010; 35:1530–7.

Bannister, JV; Calabrese, L. Assay for SOD. *Meth Biochem.* 1987; 32,279-312.

Barbiero JK, Santiago R, Tonin FS, Boschen S, da Silva LM, Werner MF, da Cunha C, Lima MM, Vital MA. PPAR- α agonist fenofibrate protects against the damaging effects of MPTP in a rat model of Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2014; 4:35-44.

Barcia C, Ros CM, Annese V, Gómez A, Ros-Bernal F, Aguado-Yera D, Martínez-Pagán ME, de Pablos V, Fernandez-Villalba E, Herrero MT. IFN- γ signaling, with the synergistic contribution of TNF- α , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis.* 2011; 2(4):e142.

Barnum CJ, Tansey MG. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 2010; 184:113-32.

Bayod S, Del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Camins A, Escorihuela RM, Pallàs M. Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol.* 2011; 111(5):1380-90.

Beltowski J, Wójcicka G, Mydlarczyk M, Jamroz A. The effect of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPARalpha) agonist, fenofibrate, on lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and plasma paraoxonase 1 (PON 1) activity. *J Physiol Pharmacol.* 2002; 53(3):463-75.

Berchtold NC, Chinn G, Chou M, Kessler JP, Cotman CW: Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 2005; 133:853-61.

Bezard E, Gerlach I, Moratalla R, Gross CE, Jork R. 5-HT1A receptor agonist-mediated protection from MPTP toxicity in mouse and macaque models of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2006; 23(1):77-86.

Blandini F, Armentero MT. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012; 279(7):1156-66.

Bloomer RJ, Schilling BK, Karlage RE, Ledoux MS, Pfeiffer RF, Callegari J. Effect of resistance training on blood oxidative stress in Parkinson disease. *Med Sci Sports Exerc.* 2008; 40(8):1385-9.

Blum D. Decline in Verbal Memory Associated with Duration of Epilepsy: An Intracarotid Amobarbital Study. *Epilepsy Behav.* 2001; 2(5):448-53.

Bolin DC, Donahue JM, Vickers ML, Giles RC, Harrison L, Jackson C, Poonacha KB, Roberts JE, Sebastian MM, Sells SE, Tramontin R, Williams NM. Equine abortion and premature birth associated with *Cellulosimicrobium cellulans* infection. *J Vet Diagn Invest.* 2004; 16(4):333-6.

Branchi I, D'Andrea I, Cirulli F, Lipp HP, Alleva E. Shaping brain development: mouse communal nesting blunts adult neuroendocrine and behavioral response to social stress and modifies chronic antidepressant treatment outcome. *Psychoneuroendocrinology.* 2010; 35(5):743-51.

Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, Kozłowska E, Drela N, Chalimoniuk M, Stepień A. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neurosci Lett.* 2008; 441(2):158-62.

Brothers HM, Bardou I, Hopp SC, Marchalant Y, Kaercher RM, Turner SM, Mitchem MR, Kigerl K, Wenk GL. Time-Dependent Compensatory Responses to Chronic Neuroinflammation in Hippocampus and Brainstem: The Potential Role of Glutamate Neurotransmission. *J Alzheimers Dis Parkinsonism.* 2013; 3:110.

Bustos G, Abarca J, Bustos V, Riquelme E, Noriega V, Moya C, Campusano J. NMDA receptors mediate an early upregulation of brain-derived neurotrophic factor expression in substantia nigra in a rat model of presymptomatic Parkinson's disease. *J Neurosci Res.* 2009; 87:2308-18.

Caiazzo M, Dell'Anno MT, Dvoretzkova E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D, Sotnikova TD, Menegon A, Roncaglia P, Colciago G, Russo G, Carninci P, Pezzoli G, Gainetdinov RR, Gustincich S, Dityatev A, Broccoli V. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature.* 2011; 476(7359):224-7.

Calabrese V, Mancuso C, Sapienza M, Puleo E, Calafato S, Cornelius C, Finocchiaro M, Mangiameli A, Di Mauro M, Stella AM, Castellino P. Oxidative stress and cellular stress response in diabetic nephropathy. *Cell Stress Chaperones.* 2007; 12(4):299-306.

Carvalho MM, Campos FL, Coimbra B, Pêgo JM, Rodrigues C, Lima R, Rodrigues AJ, Sousa N, Salgado AJ. Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Mol Neurodegener.* 2013; 8:14.

Carvalho AF, Dimellis D, Gonda X, Vieta E, McIntyre RS, Fountoulakis KN. Rapid cycling in bipolar disorder: a systematic review. *J Clin Psychiatry.* 2014; 75(6):e578-86.

Carvey PM, Punati A, Newman MB. Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. *Cell Transplant.* 2006; 15:239-50.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 328(2):309-16.

Chae HJ, Park JM, Lee GY, Park HR, Chae SW, Jeong GS, Kim HM, Kim SB, Yoo SK, Kim HR. Yuk-Hap-Tang induces apoptosis by intervening mn-SOD in human cervical carcinoma HeLa cells. *Am J Chin Med.* 2004; 32(6):883-95.

Chan DC. Dissecting mitochondrial fusion. *Dev Cell.* 2006; 11(5):592-4.

Chan-Palay V, Asan E. Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J Comp Neurol*. 1989; 287:373-92.

Chae IH, Park KW, Kim HS, Oh BH. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Chim Acta*. 2004; 341(1-2):83-91

Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J Immunol*. 1992; 149(8):2736-41.

Chen H, Weber AJ. Brain-derived neurotrophic factor reduces TrkB protein and mRNA in the normal retina and following optic nerve crush in adult rats. *Brain Res*. 2004; 1011: 99-106.

Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H. SIRT1 Protects against microglia-dependent beta amyloid toxicity through inhibiting NF-kappa B signaling. *J Biol Chem*. 2005; 280(48):40364-74.

Choe MA, Koo BS, An GJ, Jeon S. Effects of Treadmill Exercise on the Recovery of Dopaminergic Neuron Loss and Muscle Atrophy in the 6-OHDA Lesioned Parkinson's Disease Rat Model. Korean. *J Physiol Pharmacol*. 2012; 16(5):305-12.

Choi HJ, Lee SY, Cho Y, No H, Kim SW, Hwang H. Tetrahydrobiopterin causes mitochondrial dysfunction in dopaminergic cells: implications for Parkinson's disease. *Neurochem Int*. 1999; 48:255-62.

Ciucci MR, Ma ST, Kane JR, Ahrens AM, Schallert T. Limb use and complex ultrasonic vocalization in a rat model of Parkinson's disease: deficit-targeted training. *Parkinsonism Relat. Disord*. 2008; 14(Suppl. 2),S172-75.

Coelho M, Ferreira JJ. Late-stage Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*. 2012; 8:435-42.

Cookson MR. Alpha-synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener.* 2009; 4:1–14.

Costa MS, Ardais AP, Fioreze GT, Mioranza S, Botton PH, Souza DO, Rocha JB, Porciúncula LO: The impact of the frequency of moderate exercise on memory and brain-derived neurotrophic factor signaling in young adult and middle-aged rats. *Neuroscience.* 2012; 11:100-109.

Costa RJ, Crockford MJ, Moore JP, Walsh NP. Heat acclimation responses of an ultra-endurance running group preparing for hot desert-based competition. *Eur J Sport Sci.* 2014; 14 Suppl 1:S131-41.

Cummings JL. “Depression and Parkinson’s disease: a review”. *Am J Psych.* 1992; 149:443-54.

Członkowska A, Kurkowska-Jastrzebska I, Członkowski A, Peter D, Stefano GB. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease - a potential role for microglia and nitric oxide. *Med Sci Monit.* 2002; 8(8):RA165-77.

Da Cunha C, Wietzikoski EC, Ferro MM, Martinez GR, Vital MA, Hipólido D, Tufik S, Canteras NS. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. *Behav Brain Res.* 2008; 189(2):364-72.

Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M: Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci.* 2007; 27:9220–32.

Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003; 39(6):889-909.

De Souza CT, Nunes WM, Gobatto CA, De Mello MA. Insulin secretion in monosodium glutamate (MSG) obese rats submitted to aerobic exercise training. *Physiol Chem Phys Med.* 2003; 35:43-53.

Debeir T, Ginestet L, François C, Laurens S, Martel JC, Chopin P, Marien M, Colpaert F, Raisman-Vozari R. Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Exp Neurol*. 2005; 193(2):444-54.

Decressac M, Mattsson B, Björklund A. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein rat models of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2012; 235(1):306-15.

Dibble LE, Hale TF, Marcus RL, Gerber JP, LaStayo PC; High intensity eccentric resistance training decreases bradykinesia and improves quality of Life in persons with Parkinson's disease: a preliminary study. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009; 15:752-7.

Dietrich MO, Andrews ZB, Horvath TL. Exercise-induced synaptogenesis in the hippocampus is dependent on UCP2-regulated mitochondrial adaptation. *J Neurosci*. 2008; 28(42):10766-71.

Donmez G, Arun A, Chung CY, McLean PJ, Lindquist S, Guarente L. SIRT1 protects against α -synuclein aggregation by activating molecular chaperones. *J Neurosci*. 2012; 32(1):124-32.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990; 186:421-31.

Drzyzga LR, Marcinowska A, Obuchowicz E. Anti apoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: a review of clinical and experimental studies. *Brain Res Bull*. 2009; 30:248-57.

Dufty BM, Warner LR, Hou ST, Jiang SX, Gomez-Isla T, Leenhout KM, Oxford JT, Feany MB, Masliah E, Rohn TT: Calpain cleavage of alpha-synuclein: connecting proteolytic processing to disease-linked aggregation. *Am J Pathol*. 2007; 170:1725-38.

Dugas N, Lacroix C, Kilchherr E, Delfraissy JF, Tardieu M. Role of CD23 in astrocytes inflammatory reaction during HIV-1 related encephalitis. *Cytokine*. 2001; 15(2):96-107.

Dutra MF, Jaeger M, Ilha J, Kalil-Gaspar PI, Marcuzzo S, Achaval M: Exercise improves motor deficits and alters striatal GFAP expression in a 6-OHDA-induced rat model of Parkinson's disease. *Neurol Sci.* 2012; 33:1137-44.

Elokda A, DiFrancisco-Donoghue J, Lamberg EM, Werner WG: Effects of exercise induced oxidative stress on glutathione levels in Parkinson's disease on and off medication. *J Neurol.* 2010; 257:1648-53.

Emborg ME. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J Neurosci Methods.* 2004; 139(2):121-43.

Engesser-Cesar C, Anderson AJ, Cotman CW. Wheel running and fluoxetine antidepressant treatment have differential effects in the hippocampus and the spinal cord. *Neuroscience.* 2007; 144:1033-44.

Esposito E, Di Matteo V, Benigno A, Pierucci M, Crescimanno G, Di Giovanni G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2007; 205(2):295-312.

Esteves AR, Domingues AF, Ferreira IL, Januário C, Swerdlow RH, Oliveira CR, Cardoso SM. Mitochondrial function in Parkinson's disease cybrids containing an nt2 neuron-like nuclear background. *Mitochondrion.* 2008; 8(3):219-28.

Fahn S, Sulzer D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *Neuro Rx.* 2004; 1:139-54.

Fall PA, Fredrikson M, Axelson O, Granérus AK. Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden. *Mov Disord.* 1999; 14(1):28-37.

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RC, Janssen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin.Chim.Acta.* 1985; 153:23-6.

Fisher JC, Moulton SL. Nonoperative management and delayed hemorrhage after pediatric liver injury: new issues to consider. *J Pediatr Surg.* 2004; 39(4):619-22.

Fornai F, Schlüter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli R, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Pontarelli F, Battaglia G, Pellegrini A, Nicoletti F, Ruggieri S, Paparelli A, Südhof TC. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin–proteasome system and alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102(9):3413-8.

Fotiou DF, Stergiou V, Tsiptsios D, Lithari C, Nakou M, Karlovasitou A. Cholinergic deficiency in Alzheimer's and Parkinson's disease: evaluation with pupillometry. *Int J Psychophysiol.* 2009; 73(2):143-9.

Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med.* 2003; 348:1365-75.

Fukuchi M, Fujii H, Takachi H, Ichinose H, Kuwana Y, Tabuchi A, Tsuda M: Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca (2+) signals evoked via the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Brain Res.* 2010; 1366:18–26.

Funk JA, Gohlke J, Kraft AD, McPherson CA, Collins JB, Jean Harry G: Voluntary exercise protects hippocampal neurons from trimethyltin injury: possible role of interleukin-6 to modulate tumor necrosis factor receptor-mediated neurotoxicity. *Brain Behav Immun.* 2011; 25:1063-77.

Furukawa Y, Kish SJ, Fahn S. Dopa-responsive dystonia due to mild tyrosine hydroxylase deficiency. *Ann Neurol.* 2004; 55:147-8.

Galindo MF, Solesio ME, Atienzar-Aroca S, Zamora MJ, Jordán Bueso J. Mitochondrial dynamics and mitophagy in the 6-hydroxydopamine preclinical model of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis.* 2012; 2012:131058.

Gandhi S, Wood NW. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics.* 2005; 14:2749-55.

Gao N, Li YH, Li X, Yu S, Fu GL, Chen B: Effect of alpha-synuclein on the promoter activity of tyrosine hydroxylase gene. *Neurosci Bull.* 2007; 23:53–7.

Garcia-Esparcia P, Llorens F, Carmona M, Ferrer I. Complex Deregulation and Expression of Cytokines and Mediators of the Immune Response in Parkinson's Disease Brain is Region Dependent. *Brain Pathol.* 2014; 24(6):584-98.

Georgievska B, Kirik D, Rosenblad C, Lundberg C, Björklund A. Neuroprotection in the rat Parkinson model by intrastriatal GDNF gene transfer using a lentiviral vector. *Neuroreport.* 2002; 13(1):75-82.

Ghasemi M, Sadeghipour H, Poorheidari G, Dehpour AR: A role for nitregeric system in the antidepressant-like effects of chronic lithium treatment in the mouse forced swimming test. *Behav Brain Res.* 2009; 200:76-82.

Goldman JG, Litvan I. Mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Minerva Med.* 2011; 102:441-459.

Goodwin GM, Martinez-Aran A, Glahn DC, Vieta E. Cognitive impairment in bipolar disorder: neurodevelopment or neurodegeneration? An ECNP expert meeting report. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2008; 18:787-93.

Goto S. Deep brain stimulation in the treatment of movement disorders. *Rinsho Shinkeigaku.* 2007; 47(11):948-50.

Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol.* 2005; 193(2):279-90.

Haleagrahara N, Siew CJ, Mitra NK, Kumari M. Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum. *Neurosci Lett.* 2011; 1:948-50.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxidative stress in PD Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press: New York. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds). 2007; 744-58.

Haavik J, Toska K. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.* 1998; 16(3):285-309.

Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008; 4(11):600-9.

Hirsch EC, Vyas S, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012; 18 Suppl 1:S213-7.

Hirsch EC. Future drug targets for Parkinson's disease. *Bull Acad Natl Med*. 2012; 196:1369-77.

Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 2007; 76:751-80.

Hornberger TAJr, Farrar RP. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. *Can J Appl Physiol*. 2004; 29(1):16-31.

Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debré P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci*. 1999; 19(9):3440-7.

Je HS, Yang F, Ji Y, Nagappan G, Hempstead BL, Lu B. Role of pro-brain-derived neurotrophic factor (proBDNF) to mature BDNF conversion in activity-dependent competition at developing neuromuscular synapses. *Proc Natl Acad Sci*. 2012; 109:15924-29.

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

Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol*. 2008; 600:78-82.

Johnston LC, Su X, Maguire-Zeiss K, Horovitz K, Ankoudinova I, Guschin D, Hadaczek P, Federoff HJ, Bankiewicz K, Forsayeth J. Human interleukin-10 gene transfer is protective in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Ther*. 2008; 16(8):1392-9.

Jolitha AB, Subramanyam MV, Asha Devi S. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Exp Gerontol.* 2006; 41(8):753-63.

Kaster MP, Santos AR, Rodrigues AL. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. *Brain Res Bull.* 2005; 67:53-61.

Ke Z, Yip SP, Li L, Zheng XX, Tong KY. The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PLoS One.* 2011; 8:166-173.

Keeny PM, Xie J, Capaldi RA, Bennet JP. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci.* 2006; 26:5256-64.

Kerr DS. Treatment of mitochondrial electron transport chain disorders: a review of clinical trials over the past decade. *Mol Genet Metab.* 2010; 99:246-55.

Kish SJ. What is the evidence that Ecstasy (MDMA) can cause Parkinson's disease? *Mov Disord.* 2003; 18(11):1219-23.

Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 2003; 111:785-93.

Knott AB, Bossy-Wetzel E. Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1147:283-92.

Koprach JB, Reske-Nielsen C, Mithal P, Isacson O. Neuroinflammation mediated by IL-1 β increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation.* 2008; 27; 5:8.

Kwon DY, Seo WK, Yoon HK, Park MH, Koh SB, Park KW. Transcranial brain sonography in Parkinson's disease with restless legs syndrome. *Mov Disord.* 2010; 25(10):1373-8.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-85.

Landers MR, Kinney JW, Allen DN, Van Breukelen FA. Comparison of voluntary and forced exercise in protecting against behavioral asymmetry in a juvenile hemiparkinsonian rat model. *Behav Brain Res*. 2013; 248:121-8.

Lane EL, Soulet D, Vercammen L, Cenci MA, Brundin P. Neuroinflammation in the generation of post-transplantation dyskinesia in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2008; 32(2):220-8.

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

Lautenschlager NT, Cox KL, Flicker L, Foster JK, Van Bockxmeer FM, Xiao J, Greenop KR, Almeida OP. Effect of physical activity on cognitive function in older adults at risk for Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA*. 2008; 300:1027-37.

Lee ST, Lu CS. Ventrolateral thalamotomy for dyskinesia following levodopa therapy of Parkinson's disease. *J Formos Med Assoc*. 1996; 95(12):943-5.

Lesemann A, Reinel C, Hühnchen P, Pilhatsch M, Hellweg R, Klaisle P, Winter C, Steiner B. MPTP-induced hippocampal effects on serotonin, dopamine, neurotrophins, adult neurogenesis and depression-like behavior are partially influenced by fluoxetine in adult mice. *Brain Res*. 2012; 31:1457-51.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 1990; 186:464-78.

Li XZ, Bai LM, Yang YP, Luo WF, Hu WD, Chen JP, Mao CJ, Liu CF. Effects of IL-6 secreted from astrocytes on the survival of dopaminergic neurons in lipopolysaccharide-induced inflammation. *Neurosci Res*. 2009; 65(3):252-8.

Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med.* 1999; 5(12):1403-9.

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.* 2012; 97:140-7.

Lindgren HS, Lelos MJ, Dunnett SB. Do α -synuclein vector injections provide a better model of Parkinson's disease than the classic 6-hydroxydopamine model? *Exp Neurol.* 2012; 237(1):36-42.

Liu W, Sheng H, Xu Y, Liu Y, Lu J, Ni X: Swimming exercise ameliorates depression-like behavior in chronically stressed rats: relevant to proinflammatory cytokines and IDO activation. *Behav Brain Res.* 2013; 242:110-116.

Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-75.

Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6:603-14.

Lu C, Chan SL, Haughey N, Lee WT, Mattson MP. Selective and biphasic effect of the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal on N-methyl-D-aspartate channels. *J Neurochem.* 2001; 78:577-89.

Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro) degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011; 35:676-92.

Maetzler W, Schmid SP, Wurster I, Liepelt I, Gaenslen A, Gasser T, Berg D. Reduced but not oxidized cerebrospinal fluid glutathione levels are lowered in Lewy body diseases. *Mov Disord.* 2011; 26(1):176-81.

Mandemakers W, Morais VA, De Strooper B. A cell biological perspective on mitochondrial dysfunction in Parkinson disease and other neurodegenerative diseases. *J Cell Sci.* 2007; 120:1707-16.

Manthripragada AD1, Schemhammer ES, Qiu J, Friis S, Wermuth L, Olsen JH, Ritz B. Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology.* 2011; 36(3):155-61.

Marais L, Stein DJ, Daniels WM: Exercise increases BDNF levels in the striatum and decreases depressive-like behavior in chronically stressed rats. *Metab Brain Dis.* 2009; 24(4): 587-97.

Martínez-Martín P, Damián J. Parkinson disease: Depression and anxiety in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 2010; 6(5):243-5.

Martinowich K, Manji H, Lu B: Review New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci.* 2007; 10:1089-1093.

Masi G, Brovedani P: The hippocampus, neurotrophic factors and depression: possible implications for the pharmacotherapy of depression. *CNS Drugs.* 2011; 25:913-31.

Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappa B in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.* 2006; 13(5):852-60.

McDonald WM, Richard IH, DeLong MR: Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. *Biol Psychiatry.* 2003; 54:363-75.

McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol.* 1988; 24(4):574-6.

McGeer PL, Schwab C, Parent A, Doudet D. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol.* 2003; 54:599-604.

Miyasaki JM1, Shannon K, Voon V, Ravina B, Kleiner-Fisman G, Anderson K, Shulman LM, Gronseth G, Weiner WJ; Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Practice Parameter: evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2006; 66(7):996-1002.

Miller N, Mshana G, Msuya O, Dotchin C, Walker R, Aris E. Assessment of speech in neurological disorders: development of a Swahili screening test. *S Afr J Commun Disord*. 2012; 59:27-33.

Minagar A, Shulman LM, Weiner WJ. Transderm-induced psychosis in Parkinson's disease. *Neurology*. 1999; 22:433-434.

Mogi M, Kondo T, Mizuno Y, Nagatsu T. p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappa B levels are elevated in the parkinsonian brain. *Neurosci.Lett*. 2007; 414:94-7.

Mokry J. Experimental models and behavioural tests used in the study of Parkinson's disease. *Physiol Res*. 1995; 44(3):143-50.

Moreira PI, Siedlak SL, Aliev G, Zhu X, Cash AD, Smith MA, Perry G. Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer disease. *J Neural Transm*. 2004; 112(7):921-32.

Mounsey RB, Teismann P. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: pathogenesis and neuroprotection. *Parkinsons Dis*. 2011; 61:72-4.

Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. *Front Aging Neurosci*. 2010; 2: 34.

Navarro A, Boveris A. Brain mitochondrial dysfunction in aging: conditions that improve survival, neurological performance and mitochondrial function. *Front Biosci*. 2007; 12:1154-63.

Oakley AE, Collingwood JF, Dobson J, Love G, Perrott HR, Edwardson JA, Elstner M, Morris CM. Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology*. 2007; 68:1820-1825.

Ogonovszky H, Sasvári M, Dosek A, Berkes I, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Goto S, Radák Z. The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. *Can J Appl Physiol.* 2005; 30(2):186-95.

Olanow CW, Tatton WG. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 1999; 22:123-44.

Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2002; 68:325-40.

Pacelli C, De Rasmio D, Signorile A, Grattagliano I, Di Tullio G, D'Orazio A, Nico B, Comi GP, Ronchi D, Ferranini E, Pirolo D, Seibel P, Schubert S, Gaballo A, Villani G, Cocco T. Mitochondrial defect and PGC-1 α dysfunction in parkin associated familial Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812:1041-453.

Park SH, Choi WS, Yoon SY, Ahn YS, Oh YJ. Activation of NF- κ B is involved in 6-hydroxydopamine-but not MPP⁺- induced dopaminergic neuronal cell death: its potential role as a survival determinant. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322:727-33.

Peng X, Tehranian R, Dietrich P, Stefanis L, Perez RG. Alpha synuclein activation of protein phosphatase 2A reduces tyrosine hydroxylase phosphorylation in dopaminergic cells. *J Cell Sci.* 2005; 118:3523-30.

Peterson LJ, Flood PM. Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.* 2012. 2012:401264.

Petzinger GM, Walsh JP, Akopian G, Hogg E, Abernathy A, Arevalo P, Turnquist P, Vucković M, Fisher BE, Togasaki DM, Jakowec MW. 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. *J. Neurosci.* 2007; 27:5291-300.

Pietrelli A, Lopez-Costa J, Goni R, Brusco A, Basso N: Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. *Neuroscience.* 2012; 202:252-66.

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

Poewe WH, Rascol O, Quinn N, Tolosa E, Oertel WH, Martignoni E, Rupp M, Boroojerdi B. Efficacy of pramipexole and transdermal rotigotine in advanced Parkinson's disease: a double-blind, double-dummy, randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 2007; 6(6):513-20.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 1977; 266:730-42.

Protter D, Lang C, Cooper AA. α -Synuclein and Mitochondrial Dysfunction: A Pathogenic Partnership in Parkinson's Disease? *Parkinsons.* 2012; 2012:829207.

Qin W, Yang T, Ho L, Zhao Z, Wang J, Chen L, Zhao W, Thiyagarajan M, MacGrogan D, Rodgers JT, Puigserver P, Sadoshima J, Deng H, Pedrini S, Gandy S, Sauve AA, Pasinetti GM. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem.* 2006; 281: 21745-54.

Qureshi SU, Amspoker AB, Calleo JS, Kunik ME, Marsh L. Anxiety disorders, physical illnesses, and health care utilization in older male veterans with Parkinson disease and comorbid depression. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2012; 25(4):233-9.

Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol (1985).* 1995; 79(1):129-35.

Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev.* 2001; 7:90-107.

Radak Z, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(2):153-9.

Ramadori G, Lee CE, Bookout AL, Lee S, Williams KW, Anderson J, Elmquist JK, Coppari R. Brain SIRT1: anatomical distribution and regulation by energy availability. *J Neurosci*. 2008; 28(40): 9989-96.

Rangasamy SB, Soderstrom K, Bakay RA, Kordower JH. Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease. *Prog Brain Res*. 2010; 184:237-64.

Ravina B, Camicioli R, Como PG: The impact of depressive symptoms in early Parkinson disease. *Neurology*. 2007; 69:342-7.

Reijnders JS, Ehrt U, Weber WE, Aarsland D, Leentjens AF. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2008; 23:183-9.

Rojo A, Aguilar M, Garolera MT, Cubo E, Navas I, Quintana S. Depression in Parkinson's disease: clinical correlates and outcome. *Parkinsonism Relat Disord*. 2003; 10(1):23-8.

Rousseaux MW, Marcogliese PC, Qu D, Hewitt SJ, Seang S, Kim RH, Slack RS, Schlossmacher MG, Lagace DC, Mak TW, Park DS. Progressive dopaminergic cell loss with unilateral-to-bilateral progression in a genetic model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(39):15918-23.

Rowe DB, Le W, Smith RG, Appel SH. Antibodies from patients with Parkinson's disease react with protein modified by dopamine oxidation. *J Neurosci Res*. 1998; 53(5):551-8.

Sack MN, Finkel T. Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012; 1;4(12).

Salehi-Sadaghiani M, Javadi-Paydar M, Gharedaghi MH, Zandieh A, Heydarpour P, Yousefzadeh-Fard Y, Dehpour AR. NMDA receptor involvement in antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice. *Psychopharmacol (Berl)*. 2012; 223:345-55.

Sanchez-Mejia RO, Mucke L. Phospholipase A2 and arachidonic acid in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1801:784-90.

Santiago RM, Barbiero J, Gradowski RW, Bochen S, Lima MM, Da Cunha C, Andreatini R, Vital MA: Induction of depressive-like behavior by intra-nigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. *Behav Brain Res.* 2014; 259:70-7.

Sawada M, Imamura K, Nagatsu T. Role of cytokines in inflammatory process in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2006; (70):373-81.

Schapira AH. Mitochondrial disease. *Lancet.* 2006; 368:70-82.

Schwartz RK, Huston JP. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol.* 1996; 49(3):215-66.

Sevillano-García MD, Manso-Calderón R. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease and deep brain stimulation. *Rev Neurol.* 2010; 8:95-104.

Siamilis S, Jakus J, Nyakas C, Costa A, Mihalik B, Falus A, Radak Z: The effect of exercise and oxidant-antioxidant intervention on the levels of neurotrophins and free radicals in spinal cord of rats. *Spinal Cord.* 2009; 47:453-7.

Sian-Hulsmann J, Mandel S, Youdim MB, Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2011; 118:939-57.

Silberman DM, Ayelli-Edgar V, Zorrilla-Zubilete M, Zieher LM, Genaro AM. Impaired T-cell dependent humoral response and its relationship with T lymphocyte sensitivity to stress hormones in a chronic mild stress model of depression. *Brain Behav Immun.* 2004; 18(1):81-90.

Simola N, Morelli M, Carta AR. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2007; 11(3-4):151-67.

Smith LM, Schiess MC, Coffey MP, Klaver AC, Loeffler DA. α -Synuclein and anti- α -synuclein antibodies in Parkinson's disease, atypical Parkinson syndromes, REM sleep behavior disorder, and healthy controls. *PLoS One*. 2012; 7:e52285.

Somani SM, Husain K, Diaz-Phillips L, Lanzotti DJ, Karetí KR, Trammell GL. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. *Alcohol*. 1996; 13:603–10.

Starkstein SE, Brockman S, Hayhow BD: Psychiatric syndromes in Parkinson's disease. *Curr Opin Psychiatry*. 2012; 25:468-72.

Sung YH, Kim SC, Hong HP, Park CY, Shin MS, Kim CJ, Seo JH, Kim DY, Kim DJ, Cho HJ. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice. *Life Sci*. 2012; Dec 17;91(25-26): 1309-16.

Surendran S, Rajasankar S: Parkinson's disease: oxidative stress and therapeutic approaches. *Neurol Sci*. 2010; 31:531–40.

Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T, Kondo A, Yuan W, Kadota T, Wang F, Baba T, TayraJT, Morimoto T, Jing M, Kikuchi Y, Kuramoto S, Agari T, Miyoshi Y, Fujino H, Obata F, Takeda I, Furuta T, Date I. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain Res*. 2010; 15:200-7.

Tan LC. Mood disorders in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012; 18 Suppl 1:S74-6.

Tansey MG, Frank-Cannon TC, McCoy MK, Lee JK, Martinez TN, McAlpine FE, Ruhn KA, Tran TA. Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? *Front Biosci*. 2007; 13:709-17.

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL. Pro BDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*. 2005; 25:5455-63.

Teo WP, Rodrigues JP, Mastaglia FL, Thickbroom GW. Modulation of corticomotor excitability after maximal or sustainable-rate repetitive finger movement is impaired in Parkinson's disease and is reversed by levodopa. *Clin Neurophysiol.* 2014; 125:562-8.

Tillerson JL, Caudle WM, Reverón ME, Miller GW. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neurosci.* 2003; 119:899-911.

Trimmer PA, Schwartz KM, Borland MK, De Taboada L, Streeter J, Oron U. Reduced axonal transport in Parkinson's disease cybrid neurites is restored by light therapy. *Mol Neurodegener.* 2009; 4:26.

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

Tsai SJ, Hong CJ, Yu YW, Chen TJ. Association study of a brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism and personality trait and intelligence in healthy young females. *Neuropsychobiology.* 2004; 49:13-6.

Tsang AH, Chung KK. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792(7):643-50.

Tuon T, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Fries GR, Silva LA, Kapczinski F, Quevedo J, Pinho RA. Effects of moderate exercise on cigarette smoke exposure-induced hippocampal oxidative stress values and neurological behaviors in mice. *Neurosci Lett.* 2010; 475:16-29.

Tuon T, Valvassori SS, Lopes-Borges J, Luciano T, Trom CB, Silva LA, Quevedo J, Souza CT, Lira FS, Pinho RA. Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2012; 227:305-312.

Uemura Y, Wada-Isoe K, Nakashita S, Nakashima K. Depression and cognitive impairment in patients with mild parkinsonian signs. *Acta Neurol Scand.* 2013; 128:153-59.

Um HS, Kang EB, Leem YH, Cho IH, Yang CH, Chae KR, Hwang DY, Cho JY: Exercise training acts as a therapeutic strategy for reduction of the pathogenic phenotypes for Alzheimer's disease in an NSE/APPsw-transgenic model. *Int J Mol Med.* 2008; 22:529–39.

Ungerstedt U, Arbuthnott GW. Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 1968; 24:485-93.

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

Vanacore N, Nappo A, Gentile M, Brustolin A, Palange S, Liberati A, Di Rezze S, Caldora G, Gasparini M, Benedetti F, Bonifati V, Forastiere F, Quercia A, Meco G, Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L, Wuytack F. Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell Calcium.* 2005; 38:291-302.

Varçin M, Bentea E, Michotte Y, Sarre S. Oxidative stress in genetic mouse models of Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 2012:624925.

Vangheluwe P, Raeymaekers L, Dode L, Wuytack F. Modulating sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 2 (SERCA2) activity: cell biological implications. *Cell Calcium.* 2005; 38(3-4):291-302.

Veech GA, Dennis J, Keeney PM, Fall CP, Swerdlow RH, Parker WD Jr, Bennett JP Jr. Disrupted mitochondrial electron transport function increases expression of anti-apoptotic bcl-2 and bcl-X(L) proteins in SH-SY5Y neuroblastoma and in Parkinson disease cybrid cells through oxidative stress. *J Neurosci Res.* 2000; 15; 61(6): 693-700.

Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4:365-75.

Wareski P, Vaarmann A, Choubey V, Safiulina D, Liiv J, Kuum M, Kaasik A. PGC-1 $\{\alpha\}$ and PGC-1 $\{\beta\}$ regulate mitochondrial density in neurons. *J Biol Chem.* 2009; 284(32):21379-85.

Weintraub D, Morgan JC. Both the body and brain benefit from exercise: potential win-win for Parkinson's disease patients. *Mov Disord.* 2011; 26:607-12.

Wen Y, Li W, Poteet EC, Xie L, Tan C, Yan LJ, Ju X, Liu R, Qian H, Marvin MA, Goldberg MS, She H, Mao Z, Simpkins JW, Yang SH. Alternative mitochondrial electron transfer as a novel strategy for neuroprotection. *J Biol Chem.* 2011; 286:16504–515.

Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol.* 2007; 150:963–76.

Winklhofer K, Haass C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Bioch Biophys Acta.* 2010; 1802:29-44.

Witte ME, Geurts JJ, de Vries HE, van der Valk P, van Horssen J. Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion.* 2010; 10(5):411-8.

Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B. Activation of p75^{NTR} by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci.* 2005; 8:1069-77.

Worth PF. When the going gets tough: how to select patients with Parkinson's disease for advanced therapies. *Pract Neurol.* 2013; 13:140-52.

Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci.* 2004; 19:1699–707.

Yamanouchi H, Nagura H. Neurological signs and frontal white matter lesions in vascular parkinsonism. *Stroke.* 1997; 28:965-9.

Yang H, Zhang W, Pan H, Feldser HG, Lainez E, Miller C, Leung S, Zhong Z, Zhao H, Sweitzer S, Considine T, Riera T, Suri V, White B, Ellis JL, Vlasuk GP, Loh C. SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF- κ B activity. *PLoS One*. 2012; 7(9):e46364.

Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR. Modulation of NF-kappa B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *Embo J*. 2004; 23:2369-80.

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

Zhao XD, Zhou XP, Liu HH, Li BM, Hu XW, Li FQ, You BM. Changes of amino acid neurotransmitters in striatum of hemiparkinsonian rhesus monkey after high frequency stimulation of subthalamic nucleus. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2007; 45(24):1682-4.

Zhou C, Huang Y, Przedborski S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1147:93-104.

ANEXO 1 – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 113/2011

Professor: RICARDO PINHO

Título: “Efeitos de diferentes protocolos de exercício físico sobre marcadores de biogênese mitocondrial e parâmetros de estresse oxidativo em animais induzidos à doença de Parkinson”.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA. www.unesc.net/propex/ceua.

Criciúma, 13 de dezembro de 2011.

Jairo José Zocche
Coordenador do CEUA