



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**EFEITO TERAPÊUTICO DO EXERCÍCIO AERÓBICO EM UM
MODELO DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-
HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

André Tiago Rossito Goes

Itaqui, RS, Brasil.

2013

**EFEITO TERAPÊUTICO DO EXERCÍCIO AERÓBICO EM UM
MODELO DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-
HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**

por

André Tiago Rossito Goes

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Bioquímica,
da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, RS),
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica.**

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

**Itaqui, RS, Brasil.
2013**

**Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**EFEITO TERAPÊUTICO DO EXERCÍCIO AERÓBICO EM UM
MODELO DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-
HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**

Elaborada por
André Tiago Rossito Goes

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse (Presidente, orientador)

Prof. Dr. Felipe Pivetta Carpes (UNIPAMPA)

Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira (UFSM)

Itaqui, RS, Brasil.

2013

DEDICO

Em memória de Ana Helena Gois,
tia e madrinha querida e amada,
minha segunda mãe.

Ao meu orientador,
Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse,
pelo incentivo,
aprendizagem proporcionada,
pela amizade e, principalmente,
pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente a minha família, José, Fátima e Mariana por todo o apoio, amor, paciência e motivação incondicional em todos os momentos e, também, pelo auxílio financeiro nessa empreitada.

Ao pessoal do LaftamBio Pampa por todo auxílio durante a execução do trabalho, a amizade, as risadas e principalmente o companheirismo durante esse trabalho. Em especial aos amigos Carlos Borges Filho, Marcelo Gomes de Gomes, Lucian Del Fabbro e Leandro Cattelan Souza (parceiro de viagens e de aula).

Ao meu orientador Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse, por acreditar no trabalho, por todos os ensinamentos no decorrer do trabalho. Sou muito grato ao senhor Mestre.

Aos colegas de pós-graduação que torceram por mim e contribuíram de alguma forma para a conclusão desse trabalho.

Aos amigos de graduação João, Aline, Anderson e Marcos que sempre me apoiaram nesse caminho com a sua amizade.

À Prof^a. Dr^a. Marina Prigol por auxiliar no desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores Felipe Pivetta Carpes e Mauro Schneider Oliveira por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Aos professores e funcionários do programa de pós-graduação em Bioquímica pela oportunidade em realizar o mestrado, pela preocupação com a importância da finalização deste trabalho e, sobretudo, pela condução deste programa visando o fortalecimento de nossa formação.

À Universidade Federal do Pampa, pela oportunidade oferecida de realizar o curso de mestrado.

Ao programa de bolsas de desenvolvimento acadêmico, PBDA, pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	12
Lista de Tabelas.....	15
Perspectivas.....	73
Anexo I.....	87

PARTE I

Resumo.....	9
Abstract.....	10
Lista de Abreviaturas.....	11
Introdução.....	18
1.1 Doença de Parkinson.....	18
1.2 Exercício Físico.....	25
1.3 A 6-hidroxidopamina como modelo da DP.....	28
1.4 Estresse oxidativo e neuroinflamação.....	32
2. Objetivos.....	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivo específico.....	35

PARTE II

CAPÍTULO I

Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine.....	36
1. Introduction.....	38
2. Materials and Methods.....	40
2.1 Animals.....	40
2.2 Experimental design.....	40
2.3 Swimming training (ST) protocol.....	40

2.4 Stereotaxic surgery injection of 6-OHDA.....	41
2.5 Behavioral assessment.....	41
2.5.1 Open-field test (OFT).....	41
2.5.2 Rota-rod test.....	41
2.5.3 Tail suspension test (TST).....	42
2.5.4 Object recognition test (ORT).....	42
2.6 Tissue preparation.....	43
2.7 Biochemical Determinations.....	43
2.7.1 Citrate synthase (CS) activity.....	43
2.7.2 Reactive species (RS) levels.....	43
2.7.3 Interleukin-1 beta (IL-1 β).....	43
2.7.4 Catalase (CAT) activity.....	44
2.7.5 Glutathione S-transferase (GST) activity.....	44
2.7.6 Glutathione peroxidase (GPx) activity.....	44
2.7.7 Glutathione reductase (GR) activity.....	44
2.7.8 DA, DOPAC and HVA levels.....	45
2.8 Protein determination.....	45
2.9 Statistical analysis.....	45
3. Results.....	45
3.1 Behavioural assessment.....	45
3.1.1 Locomotor activity in the OFT.....	45
3.1.2 Coordination activity in rota-rod test.....	46
3.1.3 Depressive-like behavior in the TST.....	46
3.1.4 Short-term memory (STM) in ORT.....	46
3.1.5 Long-term memory in ORT.....	47

3.2 Assessment of muscle oxidative metabolism.....	47
3.3 Biomarkers of oxidative stress.....	47
3.3.1 RS levels.....	47
3.3.2 IL-1 β (proinflammatory cytokines) levels.....	47
3.3.3 DA, DOPAC AND HVA levels.....	48
3.3.4 CAT activity.....	48
3.3.5 GST activity.....	48
3.3.6 GPx activity.....	49
3.3.7 GR activity.....	49
4. Discussion.....	49
References.....	54

PARTE III

Discussão.....	67
Conclusões.....	72
Referências.....	74

PARTE I

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa, RS, Brasil

EFEITO TERAPÊUTICO DO EXERCÍCIO AERÓBICO EM UM MODELO DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS

Autor: André Tiago Rossito Goes
Orientador: Cristiano Ricardo Jesse
Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 17 de janeiro de 2013.

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada por uma degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal e depleção de dopamina (DA) no corpo estriado. O exercício físico tem demonstrado ser uma abordagem não farmacológica promissora para reduzir o risco de doenças neurodegenerativas. Este estudo investigou o efeito potencial neuroprotetor do treinamento de natação (TN) em um modelo animal da DP induzida por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) em camundongos. O presente estudo demonstrou que um TN de 4 semanas foi eficaz em atenuar as seguintes deficiências resultantes da exposição a 6-OHDA: depressão como o comportamento em teste de suspensão da cauda, aumento no número de quedas no teste rota-rod; diferenciação na memória de longo prazo no teste de reconhecimento de objeto, o aumento dos níveis de espécies reativas; inibição da enzima glutathione peroxidase (GPx) atividades aumentadas da glutathione reductase (GR) e da glutathione S-transferase (GST), aumento do nível de interleucina 1-beta (IL-1 β) e redução os níveis de DA, ácido homovanílico (HVA) e 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC). Os mecanismos envolvidos no presente estudo são a modulação da atividade da GPx, GR e GST e níveis de IL-1 β em um modelo de DP induzida pela 6-OHDA, em camundongos e portanto, a proteção contra a diminuição dos níveis de DA, DOPAC e HVA no estriado. Estes resultados reforçam que um dos efeitos induzidos pelo exercício em doenças neurodegenerativas, tais como DP, é devido ao efeito antioxidante e anti-inflamatório. Sugerimos que o exercício atenua os declínios cognitivos e motores, depressão, estresse oxidativo e neuroinflamação induzidas pela 6-OHDA suportando a hipótese de que o exercício pode ser usado como uma ferramenta não farmacológica para reduzir os sinais da DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, exercício, 6-hidroxi-dopamina, deficit cognitivo, estresse oxidativo, neuroinflamação.

ABSTRACT

Dissertation of Master
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF SWIMMING TRAINING IN A MOUSE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE INDUCED BY 6- HYDROXYDOPAMINE

Author: André Tiago Rossito Goes

Advisor: Cristiano Ricardo Jesse

Site and Date of Defence: Uruguaiana, January 17, 2013.

Parkinson's disease (PD) is characterized by progressive degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system and dopamine (DA) depletion in the striatum. Exercise has been showed to be a promising non-pharmacological approach to reduce the risk of neurodegeneration disease. This study was designed to investigate the potential neuroprotective effect of swimming training (ST) in a mouse model of PD induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in mice. The present study demonstrated that an 4-week ST was effective in attenuating the following impairments resulting from 6-OHDA exposure: depressive-like behavior in tail suspension test; increase in number of falls in rota rod test; impairment on long-term memory in the object recognition test; increased reactive species levels; inhibition of the glutathione peroxidase (GPx) activity and rise the glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) activities; increased interleukin 1-beta (IL-1 β) level and decrease the levels of DA, homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)). The mechanisms involved in this study are the modulation of GPx, GR and GST activities and IL-1 β level in a PD model induced by 6-OHDA in mice, and hence protecting against the decrease of DA, DOPAC and HVA levels in striatum of mice. These findings reinforce that one of the effects induced by exercise on neurodegenerative disease, such as PD, is due to antioxidant and anti-inflammatory properties. We suggest that exercise attenuates cognitive and motor declines, depression, oxidative stress, and neuroinflammation induced by 6-OHDA supporting the hypothesis that exercise can be used as a non-pharmacological tool to reduce the signs of PD.

Key words: Parkinson's disease, exercise, 6-hydroxydopamine, cognitive impairment, oxidative stress, neuroinflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP – doença de Parkinson
DA – dopamina
SNc – substância negra parte compacta
SNC – sistema nervoso central
EROs – espécies reativas de oxigênio
ERNs – espécies reativas ao nitrogênio
SOD – superóxido dismutase
CAT – catalase
GPx – glutathione peroxidase
TNF- α – fator de necrose tumoral-alfa
IL-1 β – interleucina 1-beta
BDNF – fator de crescimento derivado do cérebro
6-OHDA – 6-hidroxidopamina
MPTP – 1-metil 4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
MAO – monoamina oxidase
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
LPS – lipopolissacarídeo
COX-2 – cicloxigenase-2
NA – noradrenalina
5-HT – serotonina
Ach – acetilcolina
TN – treinamento de natação
TST – teste de suspensão de cauda
TRO – teste de reconhecimento de objetos
MLP – memória de longo prazo
ER – espécies reativas
HVA – ácido homovanílico
DOPAC – 3,4-di-hidroxifenilacético

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1. Ilustração dos mecanismos e vias da dopamina envolvidos na DP e em situação normal.

Figura 2. Quadro clínico e patológico da doença de Parkinson. Esquerda (acima): neurodegeneração dopaminérgica e aparecimento dos sintomas motes e não motores na DP. Direita (acima): demonstração de alguns sintomas motores e não motores da DP. Abaixo: degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNC em indivíduo saudável e DP.

Figura 3. Rota da síntese de DA e NA.

Figura 4. Comparação entre as estruturas químicas da 6-OHDA (Esq.) e da DA (Dir.).

Figura 5. Neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA. DAT: transportador de DA. MOA-A; monoamina oxidase A. EROs: espécies reativas de oxigênio.

Figura 6. Mecanismos de ação dos diversos modelos utilizados para DP.

Figura 7. Fatores potenciais de ativação da microglia no SNC na contribuição para a degeneração de neurônios dopaminérgicos na DP.

PARTE II

Figura1. Estudo experimental do estudo.

Figura2. Efeito de 4 semanas de ST e injeção por cirurgia estereotaxica de 6-OHDA no TST. Valores são média \pm S.E.M. (n = 10 por grupo). ^b P <0,05 quando comparado com sedentário/6-OHDA com sedentário/veículo. ^d P <0,05 quando comparado exercício/6-OHDA com sedentário/6-OHDA (two-way ANOVA e Newman-Keuls de comparação múltipla).

Figura 3. Efeito de 4 semanas de ST e injeção por cirurgia estereotaxica de 6-OHDA no STM (A) e LTM (B). Valores são média \pm S.E.M. (n = 10 por grupo). ^b P <0,05 quando comparado sedentário/6-OHDA com sedentário/veículo. ^d P <0,05 quando comparado exercício/6-OHDA com sedentário/6-OHDA (two-way ANOVA e Newman-Keuls de comparação múltipla).

Figura4. Efeito de 4 semanas de ST e injeção por cirurgia estereotaxica de 6-OHDA na atividade da CS no músculo quadríceps femoral (A), RS (B) e níveis de IL-1 β (C) no estriado de camundongo. Valores são média \pm S.E.M. (n = 10 por grupo). ^a P <0,05 quando comparado sedentário/veículo com exercício/veículo. ^b P <0,05 quando comparado sedentário/6-OHDA com sedentário/veículo. ^d P <0,05 quando comparado exercício/6-OHDA com sedentário/6-OHDA. ^e P <0,05 quando comparado exercício/6-OHDA com sedentário/veículo (two-way ANOVA e Newman-Keuls de comparação múltipla).

Figura 5. Efeito de 4 semanas de ST e injeção por cirurgia estereotaxica de 6-OHDA nos níveis de DA (A), DOPAC (B) and HVA (C) estriado de camundongo. ^b P<0,05 quando comparado sedentário/6-OHDA com sedentário/veículo. ^d P<0.05 quando comparado exercício/6-OHDA com sedentário/6-OHDA. ^e P<0,05 quando comparado exercício/6-OHDA com sedentário/veículo (two-way ANOVA e Newman-Keuls de comparação múltipla).

LISTA DE TABELAS

PARTE I

Tabela 1. Classificação, mecanismo de ação e efeitos adversos dos principais fármacos utilizados no tratamento da DP.

Tabela 2. Diferentes modelos utilizados para DP em animais.

PARTE II

Tabela 1. Efeito de 4 semanas de ST e injeção cirúrgica de 6-OHDA na número de rearing, distancia, velocidade, latência de primeira queda e número de queda em camundongos.

Tabela 2. Efeito de 4 semanas de ST e injeção cirúrgica de 6-OHDA na atividade da CAT, GST, GPx and GR no estriado de camundongos.

APRESENTAÇÃO

Os resultados que compõe esta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item artigo científico. As seções materiais e métodos, resultados, discussão dos resultados e referências bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam à íntegra deste estudo.

Os itens discussão e conclusões, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados apresentados no artigo científico contido neste trabalho.

As referências bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução, discussão e conclusões desta dissertação.

INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é um transtorno neurodegenerativo, sendo relacionada mais comumente à idade, tendo a segunda maior prevalência em humanos (a primeira é a doença de Alzheimer) (Tadaiesky, 2010). Aproximadamente 1% da população mundial acima dos 55 anos é portadora da DP (Hayes et al., 2010). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2000), existem aproximadamente 222 mil parkinsonianos no Brasil, sendo que 2% dos brasileiros acima dos 60 anos são acometidos por este transtorno. Com o aumento da população idosa, acredita-se que o número de pessoas diagnosticadas com DP deve aumentar rapidamente nos próximos anos.

Em 1817, o médico inglês James Parkinson descreveu a DP em um ensaio denominado de “Ensaio da paralisia agitante” vindo a receber seu nome posteriormente (Meneses e Teive, 2003; Lim, 2005). Lewy, em 1912, observou contencções citoplasmáticas hialinas em neurônios dopaminérgicos de pacientes com DP, o que conhecemos até hoje como corpos de Lewy (Takahashi e Wakabayashi, 2005). Em 1930, Hassler descreveu a perda de neurônios nos núcleos basais de Meynert (Mori, 2005) e ainda em 1938, observou que a substância negra e *locus coeruleus* encontravam-se lesados em pacientes da DP (Takahashi e Wakabayashi, 2005) (Figura 1). Conforme Lee Mosley et al. (2006) a doença manifesta-se em média por volta dos 55 anos de idade e a sua incidência tende a aumentar com o envelhecimento e ainda, é aproximadamente 1.5 vezes mais frequente nos homens que nas mulheres em todas as idades (Elbaz et al., 2007). Uma possível explicação para o fato que a DP tenha maior incidência no sexo masculino seria o papel neuroprotetor dos esteroides sexuais femininos, em especial a progesterona (hormônio esteroide feminino produzido nas células do corpo lúteo do ovário) que possui receptores por todo o cérebro e poderia atuar como neuroprotetor, além de reforçar as capacidades cognitivas e neurogenese (Casas et al., 2011).

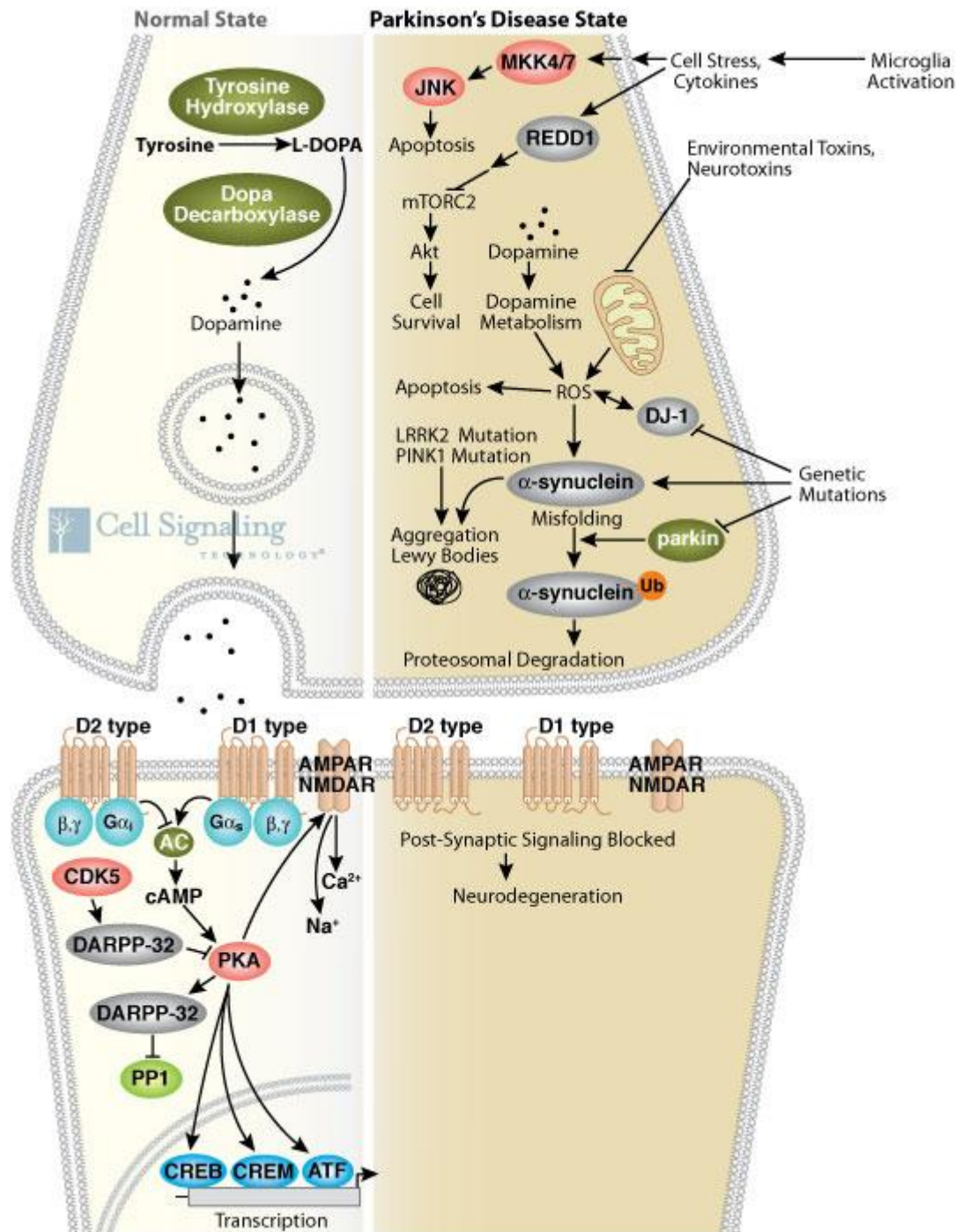


Figura 1. Demonstração dos mecanismos e vias da dopamina envolvidos na DP e em situação normal. D1 e D2: receptores de dopamina.

Fonte: <http://www.cellsignal.com/reference/pathway/parkinsons_disease.html>

Clinicamente, a DP é caracterizada pelos sinais motores (Figura 2) clássicos relacionados à patologia: tremor em repouso, diminuição dos movimentos voluntários, bradicinesia, rigidez, postura curvada e instabilidade postural. O tremor em repouso é o sintoma inicial em cerca de 60-70% dos pacientes, não sendo necessariamente

incapacitante por ser atenuado pelo movimento voluntário (Yanagisawa, 2006). A diminuição da mobilidade é decorrente da dificuldade de programação e execução dos movimentos (Klockgether, 2004). A rigidez muscular pode ser definida como um aumento da resistência da articulação durante um movimento passivo (Dauer e Przedborski, 2003) e capacidade reduzida de relaxar os músculos dos membros (Klockgether, 2004). Sendo um sintoma comum na patologia, a instabilidade postural compromete a capacidade do paciente de manter o equilíbrio durante as tarefas diárias, tais como levantar, andar e curvar-se, aumentando o risco de quedas do paciente (Morris et al. 2000).

Como principal característica neuropatológica, a lesão dos neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra parte compacta (SNc) (Figura 2), responsáveis por enviar projeções para os gânglios da base, ocasionando uma redução nos níveis de dopamina (DA) no corpo estriado, além de alterações em suas conexões com o córtex pré-frontal (Blandini et al., 2000; Araki et al., 2001). Entretanto, a neuropatologia da DP não está restrita exclusivamente à via nigroestriatal, de forma que são notadas anomalias histológicas também em outros grupos celulares dopaminérgicos e não dopaminérgicos, tais como os sistemas noradrenérgicos, serotonérgicos e colinérgicos, bem como córtex cerebral, bulbo olfativo e sistema nervoso autônomo (Dauer e Przedborski, 2003).

A causa primária da DP não está muito clara. Sabe-se, em estudos epidemiológicos, que alguns fatores ambientais podem estar associados ao aumento do risco de desenvolvimento da DP, como a exposição a alguns tipos de herbicidas e pesticidas, como por exemplo, a rotenona e paraquat (Liou et al., 1997; Gorell et al., 1998; Fall et al., 1999; Vanacore et al., 2002). Além disso, sugere-se que a DP poderia estar associada ao estresse oxidativo desencadeado por um ou mais fatores, tais como envelhecimento cerebral, predisposição genética, anomalias mitocondriais (como falha na fosforilação oxidativa pela inibição do complexo I), produção de radicais livres e toxinas ambientais (Olanow et al., 1998; Alexi et al., 2000). O fato para essa hipótese é que os neurônios dopaminérgicos são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo, por fatores como o metabolismo da DA, auto-oxidação, níveis aumentados de ferro (gerando assim a reação de Fenton, que gera radicais hidroxila a partir da reação do Fe^{2+} com peróxido de hidrogênio) e reduzidos de glutatona total em comparação a outras regiões cerebrais (Jenner, 2003; Berg et al., 2004).

Os sintomas só começam a aparecer quando se tem apenas de 20-40% de DA no estriado em relação ao normal (Rang et al., 2007). Com isso, surgiu a hipótese de que haveria a cooperação pós-sináptica entre a acetilcolina (Ach) (excitatória) e a DA (inibitória) no estriado contribuiria para os sintomas da DP (Barbeau, 1962; Rang et al., 2007; Threlfell e Cragg, 2011). Sendo que, anticolinérgicos eram utilizados primeiramente para o tratamento da DP (White e Westerbeke, 1961).

Além dos sintomas motores, existem sintomas pré-motores ou não motores (Figura 2), como distúrbios emocionais, cognitivos e psicossociais frequentemente observados antes dos sintomas motores portadores da DP (Tadaiesky et al., 2008; Savica et al., 2010; Hayes et al., 2010). Sendo assim, a DP tratar-se de uma doença multidimensional, associando a sintomatologia da perda dos movimentos há diversos sintomas que resultam em uma perda na qualidade de vida do indivíduo (Gupta e Bathia, 2000). Dentre os sintomas pré-motores verificados na DP, pode-se destacar: depressão (Santamaria et al., 1986; Cummings, 1992; Oertel et al., 2001; Hayes et al., 2010; Casas et al., 2011), ansiedade (Maricle et al., 1995; Witjas et al., 2002; Richard et al., 2004) e prejuízos cognitivos (Owen et al., 1995; Pillon et al., 1997; Goldman et al., 1998). Dentre elas, a depressão possui a maior incidência (com prevalência de 2,7 – 76% dos casos), sendo que a severidade dela aumenta conforme a evolução da DP (Leentjens et al., 2003), seguindo pela ansiedade (acima de 40%) (Richard, 2005), sendo a depressão e a ansiedade podem ocorrer simultaneamente (Menza et al., 1993; Marinus et al., 2002), e as disfunções cognitivas aparecem em todos os estágios da doença (prevalência entre 11 e 36% dos pacientes) (Giladi et al., 2000). Essas alterações se desenvolverem antes do aparecimento dos sinais motores e do diagnóstico da DP, sugerindo assim a ocorrência de alterações cerebrais na fase inicial da doença, fato esse que levaria a uma maior predisposição ao desenvolvimento de sintomas psiquiátricos e alterações cognitivas (Tolosa et al., 2009).

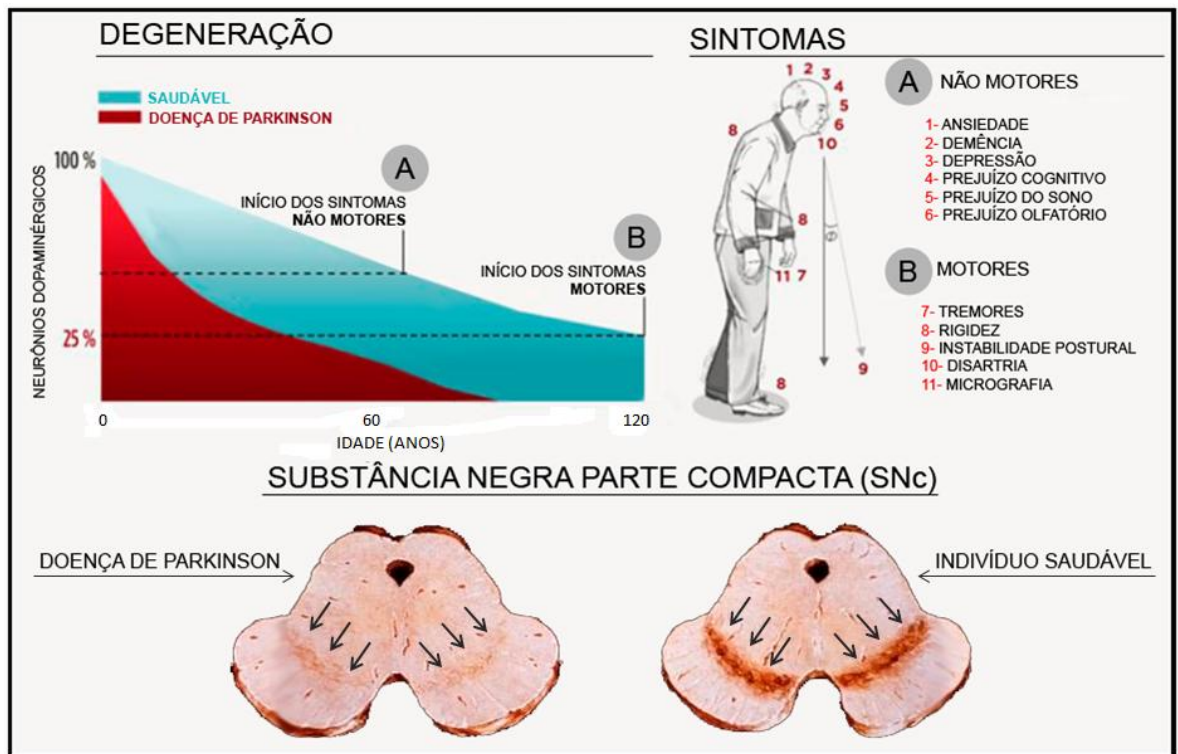


Figura 2. Quadro clínico e patológico da doença de Parkinson. Esquerda (acima): neurodegeneração dopaminérgica e aparecimento dos sintomas motes e não motores na DP. Direita (acima): demonstração de alguns sintomas motores e não motores da DP. Abaixo: degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNc em indivíduo saudável e DP. Modificada de Aguiar Junior (2011).

Embora a depleção de DA seja a maior responsável pelas alterações motoras características da DP, acredita-se que alterações em outros neurotransmissores, principalmente noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) e Ach, estejam associadas ao amplo espectro de sintomas motores e não motores nos pacientes com DP (Aguiar Junior, 2011). A DA está envolvida em diversos distúrbios da função cerebral, principalmente na DP, esquizofrenia e o distúrbio do deficit de atenção, bem como na dependência de fármacos (no fator dependência, acredita-se que o receptor D₁ esteja mais relacionado, uma que em animais transgênicos a esse receptor não demonstram dependência aos fármacos (Sibley, 1999)) e certos distúrbios endócrinos, sendo que muitos fármacos utilizados clinicamente para o tratamento de tais situações agem diretamente na transmissão de DA (Rang et al., 2007).

No cérebro a distribuição de DA é mais abundante no corpo estriado, parte do sistema motor extrapiramidal envolvido na coordenação motora, e elevadas concentrações também ocorrem em certas partes do sistema límbico e do hipotálamo. Sua síntese segue a mesma rota da NA (Figura 3), especificamente a conversão de

tirosina para dopa (passo limitante da velocidade da reação), seguida por descarboxilação para formar DA. Por não possuírem a dopamina β-hidroxilase, os neurônios dopaminérgicos não produzem também NA (Rang et al., 2007).

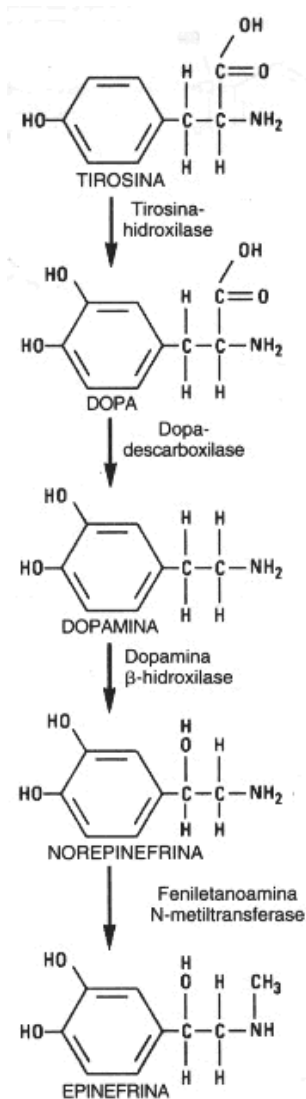


Figura 2. Rota da síntese de DA e NA.

Fonte: <<http://www.hu.uel.br/index.php?pagina=129&pai=5>>

O tratamento farmacológico na DP se dá pela neuroproteção e pelo controle dos sintomas motores e cognitivos. A levodopa, precursor metabólico da DA, é o medicamento mais comumente utilizado no tratamento da DP (Hauser et al., 2009; Katezenschlager e Lees, 2002), sendo desenvolvido na década de 60 (Cotzias et al., 1969). Assim, a sua administração tem o papel de aumentar os níveis de DA cerebral. Geralmente, a ingestão da levodopa é feita juntamente com inibidores da dopa-

descarboxilase, para que sua biodisponibilidade seja aumentada no sistema nervoso central (SNC) (Rinaldi, 2011). Entretanto, o uso prolongado deste medicamento pode trazer consequências, tais como, aparição dos sintomas antes da próxima dose e discinesias (Katezenschlager e Lees, 2002).

Além da levodopa, outros medicamentos (Tabela 1) são utilizados na DP: anticolinérgicos, liberadores de dopamina, inibidores periféricos da dopa-descarboxilase, agonistas dopaminérgicos, inibidores da monoamina oxidase (MAO), principalmente a MAO-B, e da COMT (Jankovic e Stacy, 2007; Archibald e Burn, 2008). Recentemente, a levodopa tem sido considerada a terapia padrão para os pacientes com DP e apresenta maior eficácia com menos efeitos colaterais quando comparada com os agonistas dopaminérgicos (Abbruzzese, 2008; Murata, 2009).

Tabela 1. Classificação, mecanismo de ação e efeitos adversos dos principais fármacos utilizados no tratamento da DP. Adaptado de Rinaldi, (2011).

Classificação dos Fármacos	Mecanismo de Ação	Efeitos Adversos
Anticolinérgicos (Triexfenidil, Biperideno)	Inibem a ação da Ach	Confusão, alucinações
Liberadores de Dopamina (Amantadina)	Antagonistas de receptores excitatórios	Disfunção cognitiva, alucinações
Precursor dopaminérgico (Levodopa)	Sofre ação da dopadescarboxilase, dando origem à DA. Parte é metabolizada em DA antes de atingir o SNC	Náusea, vômito, alucinações visuais, sonolência, discinesia
Inibidores periféricos da dopa-descarboxilase	Impedem o metabolismo da levodopa antes de atingir o SNC	Náusea, vômito, alucinações visuais, sonolência, discinesia
Agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, pergolida, pramipexol)	Não necessitam de transformação enzimática para serem ativas. Agem nos receptores de DA na SNC	Náusea, hipotensão, alucinações, dores de cabeça, problemas no sono, fibrose pulmonar
Inibidores da MAO-B (selegilina, rasageline)	Agem no SNC impedindo a remoção da DA após utilizada pelo receptor	Perda de peso, vômito, problemas no equilíbrio, hipotensão
Inibidores da COMT (entacapone, tolcapone)	Agem tanto no SNC quanto fora dele, junto com a MAO-B. Esta enzima também inibe a transformação da levodopa em 3-Ometildopa, substância sem efeito terapêutico	Diarréia, discinesia, toxicidade no fígado

1.2 Exercício físico

O exercício físico vem sendo utilizado nos programas de reabilitação de doenças neurodegenerativas, inclusive na DP, sendo o seu efeito paliativo conhecido desde a década de 1950 para pacientes em diversos estágios (ACSM, 2000; Aguiar Junior, 2011). Desde então, vem crescendo exponencialmente o interesse dos efeitos do exercício físico à saúde, sendo que nos dias atuais existem mais de 50000 trabalhos nos bancos de dados (Aguiar Junior, 2011). Na contramão, o sedentarismo tornou-se um fator de risco para muitas doenças, como a obesidade, diabetes tipo 2 e doenças arterio-vasculares (Berlin e Colditz, 1990; ACSM, 2000; Knowler et al. 2002). Sendo assim, em estudos mais recentes, tem-se sugerido que o sedentarismo poderia ser um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Trejo et al., 2002; Colcombe et al., 2003; Colcombe et al., 2006; Villar-Cheda et al., 2009).

Alterações biológicas agudas e crônicas induzidas pelo exercício físico dependem do princípio de treinamento físico utilizado, sendo assim, nem todo exercício físico apresenta impacto significativo no sedentarismo.

No treinamento físico, esse impacto aumenta, principalmente nos treinamentos aeróbicos. Entre as principais diferenças entre esses dois métodos são o planejamento e a estruturação do programa de exercício físico com a utilização dos princípios do treinamento, como a especificidade do gesto (andar, correr, nadar), o volume (quantidade do treinamento) e intensidade (carga de treinamento) dos exercícios (Aguiar e Prediger, 2010).

O exercício aeróbico tem como objetivo aumentar o consumo de oxigênio pelos tecidos (VO_2), sendo regulado pela capacidade máxima dos sistemas pulmonar e cardiovascular na captação e no transporte do oxigênio (VO_{2max}) para os tecidos (Bowen e Carmer, 1926; Lombardo et al., 1953), assim como a capacidade de utilização para a oxidação de substratos energéticos, como lipídeos e carboidratos (Havel et al., 1963).

A intensidade do exercício é controlada (VO_{2max} e limiar de lactato) para atividades com diversos objetivos, desde recreativos, passando controle de peso, militares, atléticos, entre outros (Haskell et al., 2007). Atualmente, as recomendações para manutenção e promoção da saúde incluem exercícios submáximos moderados (40-55% VO_{2max} , duração mínima de 30 minutos diários, cinco vezes na semana) ou exercícios submáximos (55-65% VO_{2max} , duração mínima de 20 minutos diários, três vezes por semana) (Haskell et al., 2007). Os exercícios de alta intensidade (>85% VO_{2max}) pode levar o praticante a síndrome de supertreinamento (*overtraining*), sendo

caracterizada pela queda de rendimento atlético com prejuízo à saúde (Margonis et al., 2007), inclusive a nível de sistema nervoso central (SNC), como por exemplo, ansiedade, depressão, distúrbio do sono, irritabilidade e nervosismo (Budgett et al., 1998; Kuipers, 1998; ACSM, 2000; Hedelin, 2000; Aguiar et al., 2008; Aguiar et al., 2010).

O seu efeito como agente antioxidante encontra-se intimamente ligado aos princípios de estresse x adaptação (horméticos). Sendo assim, exposições agudas ao exercício físico são indutoras de estresse oxidativo, sendo necessária a exposição crônica para o *up-regulation* das defesas antioxidantes (Fisher-Wellman e Bloomer, 2009). Seguindo essa linha, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) oriunda do exercício deve-se, principalmente, ao aumento da necessidade de consumo do oxigênio pelo músculo, assim como ao estresse redutivo provindo dos eventos cíclicos de contração muscular (isquemia-reperfusão) e pela ativação da via da xantina oxidase (Schneider e Oliveira, 2004). Devido a isso, verifica-se um aumento da expressão e da atividade de enzimas antioxidantes, tais como a SOD (superóxido dismutase), GPx (glutathiona peroxidase) e CAT (catalase) (Schneider e Oliveira, 2004; Fisher-Wellman e Bloomer, 2009).

Foi verificado o aumento da atividade de enzimas antioxidantes em regiões como córtex, corpo estriado, tronco cerebral e hipocampo resultante do treinamento físico (Somani et al., 1995; Yoon, et al., 2007; Tajiri et al., 2010; Lau et al., 2011), sendo que Fisher-Wellman e Bloomer (2009) demonstraram o importante papel do exercício físico na regulação do estresse oxidativo, após o período de adaptação, tanto em modelo animal quanto em humanos. Adicionalmente, diversos estudos sustentam o efeito anti-inflamatório do exercício físico regular (Bobinski et al., 2011; Gleeson et al., 2011). Segundo estes autores, a secreção de adrenalina e cortisol e de citocinas anti-inflamatórias, assim como o recrutamento de linfócitos T-reguladores criam um ambiente regulatório. O que se observaria, portanto, seria uma diminuição da produção do Fator de necrose tumoral-Alfa (TNF- α) e de Interleucina 1-beta (IL-1 β) pelos monócitos (via hormonal) e uma redução das subpopulações de monócitos inflamatórios (via celular). Bobinski et al. (2011) demonstrou que o exercício físico de baixa intensidade é capaz de reduzir a produção e a liberação de tais citocinas pró-inflamatórias, tanto a nível periférico quanto a nível central.

Um importante efeito benéfico do exercício no cérebro é o aumento da expressão de neurotrofinas, como o fator de crescimento derivado do cérebro (BDNF –

brain-derived neurotrophic factor), que atua como modulador de neurogênese, plasticidade neuronal e neuroproteção (Gomez-Pinilla et al., 2002; Hayes et al., 2008; Tajiri et al., 2010; Bobinski et al., 2011; Foster et al. 2011).

O exercício físico, principalmente o de caráter aeróbico, possui um importante papel no melhoramento da aprendizagem, bem como na memória de curto e longo prazo em doenças neurodegenerativas, entre as quais a DP está situada (Liu et al., 2011; Cassilhas et al., 2012). Seguindo a linha cognitiva, o exercício vem sendo estudado em modelos de depressão, sendo que os resultados encontrados demonstram uma melhora nos sintomas depressivos, bem como na qualidade de vida e convívio social (Barbour e Blumenthal, 2005; Arida et al., 2012; Brocardo et al., 2012; Eyre e Baune, 2012)

Sabe-se que o exercício físico para DP é benéfico, em ensaios clínicos randômicos tem demonstrado a eficácia do exercício a níveis físico, psicológico e social (Goodwin et al., 2008; Ayán e Cancela, 2012). Em estudos com modelo animal para a DP, vem sendo demonstrado que o exercício físico possui efeito positivo, tanto em fatores cognitivos quanto a nível enzimático (Tillerson et al., 2003; Drumond et al., 2012), além disso, nota-se uma melhora no condicionamento cardiovascular e aumento do tônus muscular (Al-Jarrah et al., 2007).

Geralmente as intervenções correlacionadas com a DP, são de âmbito terrestre (corridas, treinos de força, equilíbrio, entre outros), sendo poucos estudos em meio aquático (Goodwin et al., 2008; Vivas et al., 2011; Ayán e Cancela, 2012). Nos resultados encontrados nesses estudos, a natação foi capaz de aumentar a mobilidade e força desses pacientes, acreditando-se que as propriedades do meio aquático (flutuabilidade e pressão hidrostática) tenham ajudado principalmente por reduzir o medo de cair, fornecendo maior estímulo para que o paciente pratique os exercícios (Vivas et al., 2011; Ayán e Cancela, 2012).

Os modelos mais utilizados para reproduzir o exercício físico em animais (entre os animais, os ratos são os mais utilizados) são a corrida em esteira e a natação (Gobatto et al., 2001). Em estudos realizados, encontrou-se uma maior semelhança de adaptação ao treinamento com humanos em relação à natação (Gobatto et al., 2001; Voltarelli et al., 2002).

1.3 A 6-hidroxidopamina como modelo da DP

O modelo (Tabela 2) de DP baseado na injeção local da neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é o procedimento mais comumente utilizado para a lesão nigroestriatal em roedores (Tadaiesky, 2010). Ungerstedt (1968) demonstrou que a injeção bilateral de 6-OHDA na SNc era capaz de causar degeneração anterógrada do sistema dopaminérgico nigroestriatal, causando acinesia e alta taxa de mortalidade, sendo assim gerado o primeiro modelo de DP. Desde então, o modelo da 6-OHDA ainda é a ferramenta mais utilizada para replicar a perda de neurônios dopaminérgicos da SNc, devido à sua baixa complexidade e custo do procedimento, além de ser altamente reprodutível, em contraste com modelos mais recentes (Tadaiesky, 2010; Blesa et al., 2012). Mais ainda, ao contrário de outras toxinas utilizadas para a indução de DP, tais como o 1-metil 4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), a 6-OHDA apresenta baixo risco de toxicidade relacionada à sua manipulação (Tadaiesky, 2010; Blesa et al., 2012).

Tabela 2. Diferentes modelos utilizados para DP em animais. Adaptado de Blesa et al., 2012

Modelo	Sintomas comportamentais	Dano nigroestriatal	Agregados de sinucleína/ corpo de Lewy	Usos do modelo	Desvantagens
6-OHDA	Comportamento rotatório após a injeção unilateral	Perda de inervação no local da injeção (estriado)	Sem inclusões	Terapias para melhora dos sintomas e mecanismos de morte celular	Requer a injeção diretamente no estriado
MPTP	Deficiência motora primária e aguda em roedores	Perda de neurônios dopaminérgicos dose-dependente (95% em doses elevadas). Diminuição dos níveis de DA no estriado	Inclusões não prevalentes	Terapias para melhora dos sintomas e mecanismos de morte celular	Morte das células não é progressivo (efeito agudo)
Rotenone	Diminuição da atividade motora em roedores	Perda de inervação e de neurônios dopaminérgicos no estriado	Agregados de sinucleína nos neurônios dopaminérgicos	Testar compostos neuroprotetores	Morbidade e mortalidade substancial. Trabalho e tempo intensivo
Paraquat	Sem danos motores claros	Diminuição da imunorreatividade da tirosina hidroxilase no estriado	Sem inclusões mas com aumento da imunorreatividade sinucleína em neurônios dopaminérgicos	Testar estratégias neuroprotetoras	Não testado extensivamente. Efeitos em outros sistemas de neurotransmissores
α-sinucleína	Deficit motor severo no modelo A53T e menores no modelo A30P	Não há degeneração de neurônios dopaminérgicos observada	Agregados de sinucleína encontrados em neurônios dopaminérgicos, geralmente restito ao modelo A53T	Estudar o papel de agregados de sinucleína na DP, bem como o papel normal das sinucleína	Geralmente não há morte de neurônios dopaminérgicos nesse modelo
LRRK2	Pouco deficit comportamental observado na mutação da <i>Drosophila</i>	Nenhum efeito sobre a manutenção ou desenvolvimento de DA em knockouts, nível mínimo de degeneração	Nada observado geralmente	Estudar a relação da mutação da LRRK2 com a DP	Sem degeneração e formação de agregado de sinucleína

A 6-OHDA é tóxica tanto a nível periférico quanto central, Porter et al. (1963) demonstrou que a 6-OHDA (análogo estrutural da DA e NA; Figura 4) era capaz de causar depleção de NA nos nervos simpáticos do coração, entretanto, por não possuir a capacidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica, ela deve ser injetada diretamente no cérebro através de cirurgia estereotáxica para que possa gerar toxicidade no SNC. Os efeitos neurotóxicos da 6-OHDA ocorrem através do acúmulo da toxina nos neurônios catecolaminérgicos, seguido por alterações na homeostase celular e dano neuronal (Tadaiesky, 2010). O armazenamento intracelular de 6-OHDA é mediado pelos transportadores de membrana de DA e NA, que reconhecem e captam a 6-OHDA devido à sua similaridade estrutural com as catecolaminas endógenas (Tadaiesky, 2010; Bové e Perier, 2012).

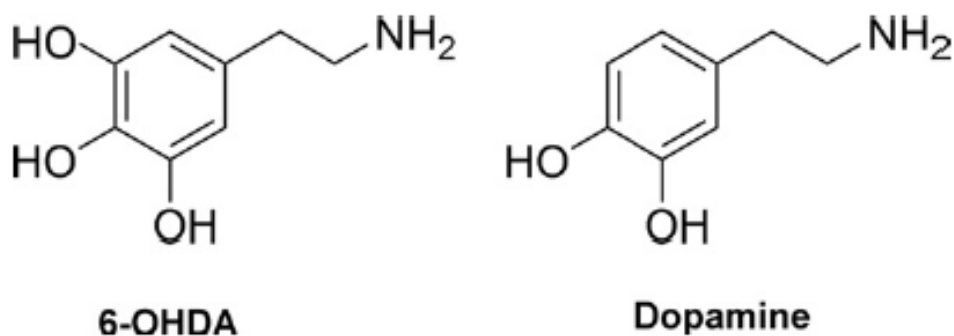


Figura 4. Comparação entre as estruturas químicas da 6-OHDA (Esq.) e da DA (Dir.). Retirado de Bové e Perier (2012)

Uma vez infundida diretamente no cérebro, a 6-OHDA produz espécies citotóxicas através de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Choi et al., 1999): a oxidação de 6-OHDA pela MAO gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, além de ser citotóxico, induz a produção de outros radicais de oxigênio (Figura 5). Além disso, a 6-OHDA sofre um processo de auto-oxidação, gerando H_2O_2 , EROs e quinonas (Kabuto & Yamanushi, 2011). Os aumentos nos níveis de EROs e outras espécies reativas resultam na rápida depleção das enzimas antioxidantes, amplificando a neurotoxicidade no metabolismo e estrutura celular resultando, assim, em dano neuronal (Blum et al., 2001). A 6-OHDA pode, além de acentuar o estresse oxidativo, induzir a neurotoxicidade alterando a função mitocondrial, sendo demonstrado que esta toxina prejudica a atividade do complexo I em mitocôndrias isoladas (Glinka e Youdim, 1995).

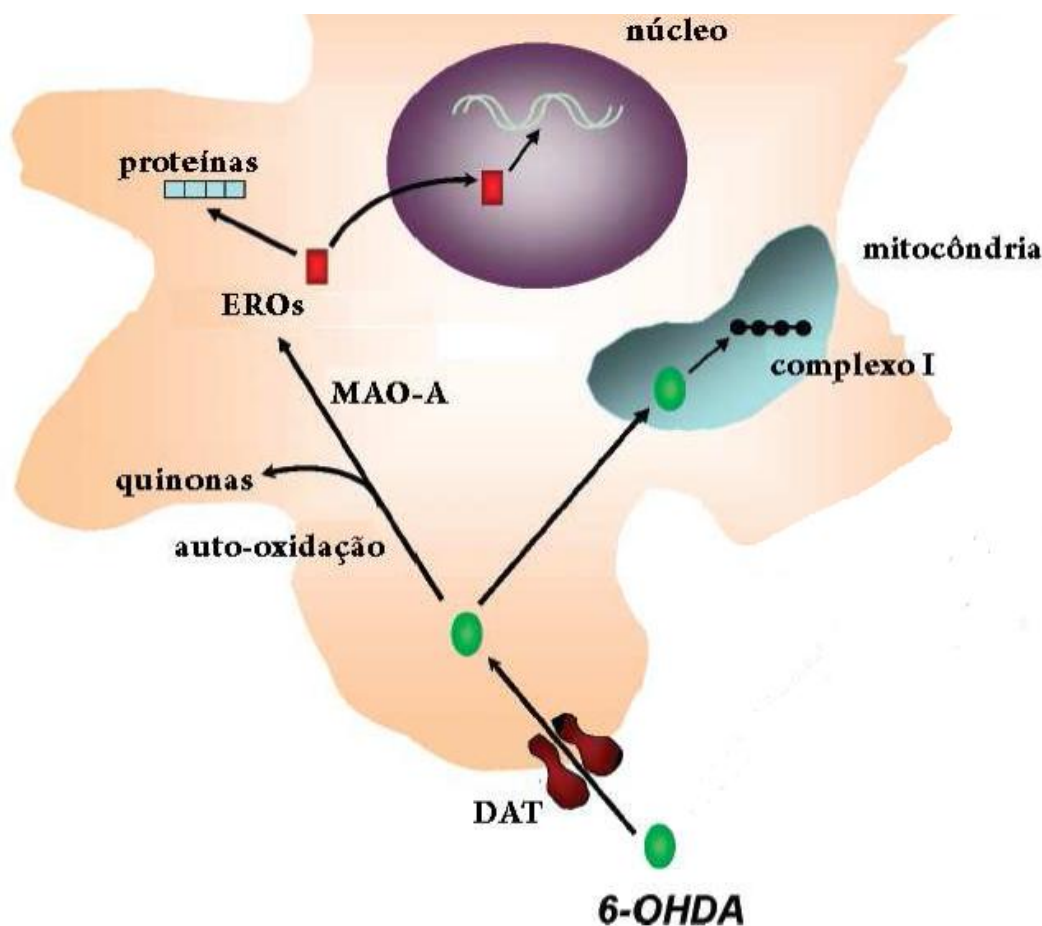


Figura 5. Neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA. DAT: transportador de DA. MOA-A: monoamina oxidase A. EROs: espécies reativas de oxigênio. Modificado de Tadaiesky, 2010

A amplitude da lesão é dose-dependente de 6-OHDA injetada e do local de injeção. Diferentes modelos utilizando 6-OHDA em roedores têm sido desenvolvidos a fim de se obter um grau de variância na neurodegeneração, do massivo ao moderado, uma vez que o grau da lesão depende da dose injetada (Fearnley e Lees, 1991; Lee et al., 1996; Tadaiesky, 2010; Bové e Perier, 2012). A injeção de 6-OHDA na SNc ou no trato nigroestriatal leva a uma destruição imediata e potencialmente completa dos neurônios dopaminérgicos da SNc e, em menor grau, da área tegmentar ventral, resultando em depleção de 80-90% de DA estriatal, produzindo assim, um modelo de DP severo (Kirik et al., 1998; Tadaiesky, 2010).

A variação do procedimento original, na qual a 6-OHDA é injetada no corpo estriado, foi proposta na década de 1990, sendo a localização dos terminais dos neurônios da SNc (Sauer e Oertel, 1994). Uma vez injetada no corpo estriado, a 6-OHDA é capaz de produzir degeneração retrógrada lenta do sistema nigroestriatal (Lee

et al., 1996), fato esse que reproduz de maneira mais próxima a progressão da DP, viabilizando assim a investigação de tratamentos neuroprotetores (Georgievska et al., 2002).

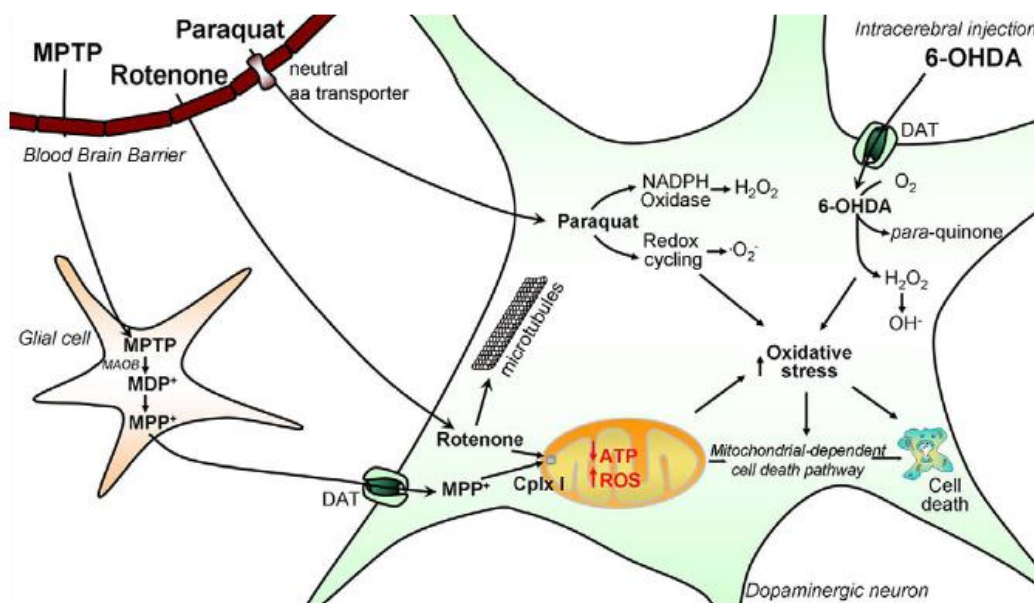


Figura 6. Mecanismos de ação dos diversos modelos utilizados para DP. Retirado de Bové e Perier (2012)

1.4 Estresse oxidativo e neuroinflamação

Acredita-se que a produção de EROs bem como a de espécies reativas ao nitrogênio (ERNs) no cérebro seja importante na defesa inespecífica deste órgão. Contudo, a hiperativação desse processo pode levar à perda de neurônios devido à alta susceptibilidade destes ao dano oxidativo (Ischiropoulos e Beckman, 2003).

As EROs e ERNs são produzidos normalmente pelo metabolismo celular, sugerindo o duplo papel desempenhado no organismo, sendo benéficas em algumas ocasiões e maléficas em outras. Em baixas e moderadas concentrações, essas espécies auxiliariam na defesa do organismo contra agentes infecciosos e envolvidas em sistemas de sinalização celular. Já em níveis elevados, elas produzem dano celular conhecido como estresse oxidativo (Valko et al., 2007).

Conforme a produção de espécies reativas extrapola a capacidade de remoção pelos antioxidantes endógenos, componentes biológicos como DNA, lipídeos, proteínas e outras moléculas sofrem alterações oxidativas por esses oxidantes resultando na alteração da célula e podendo, assim, gerar sua morte (Ischiropoulos e Beckman, 2003).

Schapira et al. (1989) relataram pela primeira vez que pacientes com DP apresentam a atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial reduzida na SNc. O possível envolvimento desse complexo na patogênese foi intensificado com a comprovação de que a neurotoxina MPTP, assim como a 6-OHDA (Glinka e Youdim, 1995; Blum et al., 2001), é capaz de produzir sinais característicos da doença em modelos animais. Quando administrada é convertida ao íon MPP^+ que se acumula no interior das mitocôndrias e inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, produzindo menor quantidade de ATP, aumento da concentração de cálcio e aumento de radicais livres (Mizuno et al., 1989; Boyson et al., 1989; Schapira et al., 1990; Watanabe et al., 2005).

A resposta imune no cérebro não envolve o sistema imune periférico, sendo assim, não há a participação de anticorpos e células. Ao invés disso, depende da síntese de componente inflamatório pelos neurônios, glia e micróglia (McGeer e McGeer, 2004).

Segundo Fahn e Sulzer (2004) células da glia e micróglia, quando há um insulto tóxico, podem produzir substâncias nocivas à célula, tais como citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas, EROs e ERNs (Figura 7).

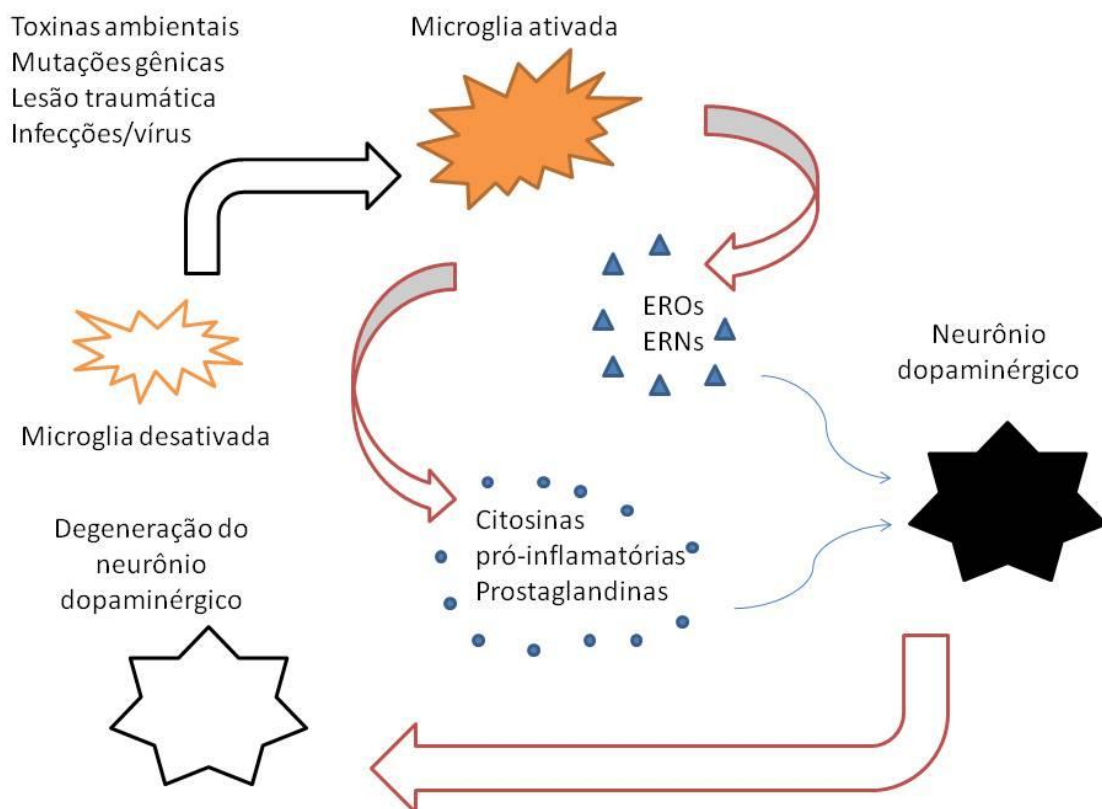


Figura 7. Fatores potenciais de ativação da microglia no SNC na contribuição para a degeneração de neurônios dopaminérgicos na DP. Adaptado de Lee et al. (2009).

Seguindo nessa linha, para McGeer e McGeer (2004) a ativação microglial pode resultar no aumento da produção de ânions superóxidos e outras neurotoxinas e tais produtos podem contribuir para processos neurotóxicos, incluindo dano a neurônios dopaminérgicos (Hirsch et al., 2005). Ainda, a ativação microglial induzida por lipopolissacarídeo (LPS) pode causar *up-regulation* da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) aumentando a síntese de prostaglandinas que podem ativar diretamente caspase-3 ou indiretamente liberar glutamato levando a excitotoxicidade (Hald e Lotharius, 2005). Nesse viés, foram relatadas na DP aumento no número de células microgliais ativas (Hirsch et al., 2005).

Devido a alguns achados, o envolvimento de processos inflamatórios na DP foi mais bem elucidado, como a descoberta de macrófagos derivado de micróglia na SNc de pacientes com DP e que a atenuação, ou até mesmo a inibição, da resposta imune microglial aumentava a sobrevivência neuronal em modelos animais da 6-OHDA e MPTP (Croisier et al., 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral investigar a eficácia da natação como possível tratamento auxiliar após um modelo para DP induzido pela infusão de 6-OHDA em camundongos.

2.2. Objetivo específico

Avaliar a aprendizagem através do teste de reconhecimento de objetos.

Analisar estado depressivo pelo teste de suspensão de cauda.

Verificar o desempenho motor através de teste de campo aberto e rota-rod.

Quantificar os níveis IL-1 β no estriado.

Analisar a atividade das enzimas CAT (Catalase) e GPx (Glutathione Peroxidase) no estriado.

Quantificar os níveis de DA e seus metabólitos no estriado.

Comparar os parâmetros de estresse oxidativo, neuroinflamação e níveis dopaminérgicos entre os grupos controle sedentário e treinado fisicamente.

PARTE II

CAPITULO I

Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine

André T.R. Goes, Leandro C. Souza, Carlos B. Filho, Lucian Del Fabbro, Marcelo G.
De Gomes, Silvana P. Boeira, Cristiano Ricardo Jesse

Submetido à *Neuropharmacology*.

Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine

André T.R. Goes, Leandro C. Souza, Carlos B. Filho, Lucian Del Fabbro, Marcelo G. De Gomes, Silvana P. Boeira, Cristiano Ricardo Jesse*

Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – LaftamBio Pampa – Universidade Federal do Pampa, Itaqui, RS, Brazil

*Correspondence should be sent to:

Cristiano R. Jesse

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – *LaftamBio Pampa* – Universidade Federal do Pampa, CEP 97650-000, Itaqui, RS, Brazil.

Phone and FAX number: +55-055-34331669

Abstract

Parkinson's disease (PD) is characterized by progressive degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system and dopamine (DA) depletion in the striatum. Exercise has been showed to be a promising non-pharmacological approach to reduce the risk of neurodegeneration disease. This study was designed to investigate the potential neuroprotective effect of swimming training (ST) in a mouse model of PD induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in mice. The present study demonstrated that an 4-week ST was effective in attenuating the following impairments resulting from 6-OHDA exposure: depressive-like behavior in tail suspension test; increase in number of falls in rota rod test; impairment on long-term memory in the object recognition test; increased reactive species and interleukin 1-beta (IL-1 β) levels; inhibition of the glutathione peroxidase (GPx) activity and rise the glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) activities and decrease the levels of DA, homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC). The mechanisms involved in this study are the modulation of GPx, GR and GST activities and IL-1 β level in a PD model induced by 6-OHDA, and hence protecting against the decrease of DA, DOPAC and HVA levels in striatum of mice. These findings reinforce that one of the effects induced by exercise on neurodegenerative disease, such as PD, is due to antioxidant and anti-inflammatory properties. We suggest that exercise attenuates cognitive and motor declines, depression, oxidative stress, and neuroinflammation induced by 6-OHDA supporting the hypothesis that exercise can be used as a non-pharmacological tool to reduce the signs of PD.

Key words: Parkinson's disease, exercise, 6-hydroxydopamine, cognitive impairment, oxidative stress, neuroinflammation.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is characterized by progressive degeneration of dopaminergic neurons in the nigrostriatal system and dopamine (DA) depletion in the striatum. While the pathogenesis of PD is not clear, damage of dopaminergic neurons by oxygen-derived free radicals is considered to be an important contributing mechanism (Kabuto and Yamanushi, 2011). At the time of diagnosis, patients typically display an array of motor impairments including bradykinesia, resting tremor, rigidity, and postural instability. Although most of the typical motor impairments are due to the

loss of nigrostriatal dopaminergic neurons, PD affects multiple neuronal systems both centrally and peripherally, leading to a constellation of non-motor symptoms including olfactory deficits, affective disorders, memory impairments, as well as autonomic and digestive dysfunction (Dasuri et al., 2012; Noyce et al., 2012).

The 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) is used to produce an animal model of PD (Tolwani et al, 1999), and is considered an endogenous toxin, having been found in urine from parkinsonian patients (Andrew et al, 1993). The toxicity of 6-OHDA is thought to be related to its ability to produce free radicals and to cause oxidative stress, which can lead to induction of inflammation and finally cell death (Khan et al., 2012; Shobana et al., 2012). 6-OHDA is susceptible to autooxidation, resulting in the formation of 6-OHDA quinone and hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), and hydroxyl radical ($\cdot OH$) (Opacka-Juffry et al., 1998). These active oxygen forms are neurotoxic because of their strong oxidizing potential (Kabuto and Yamanushi, 2011). The unilateral, intrastriatal injection of 6-OHDA induces pronounced behavioural alterations, biochemical and neurochemical deficits similar to PD (Tadaiesky et al., 2008; Santiago et al., 2010; Khan et al., 2012; Shobana et al., 2012).

Exercise has been showed to be a promising non-pharmacological approach to reduce the risk of neurodegeneration disease (Ballard et al., 2011; Pang and Hannan, 2012). It has been demonstrated that exercise can both improve and alleviate memory loss in elderly (Kramer et al. 2006). Despite the biological and molecular basis for such benefits are inconclusive, it was suggested that antioxidant and anti-inflammatory properties of physical exercise contributing for neuroprotection in models of PD in rodents (Mabandla and Russell, 2010; Tajiri et al., 2010; Dimatelis et al., 2012). In several studies, implementing continuous exercise programs for individuals in the early stages of PD has resulted in improved daily activity, motor performance, ambulation and overall functional independence (Ellis et al., 2011; Ayán and Cancela, 2012; Kara et al., 2012).

The neuroprotective impact of exercise and its mechanisms may be better investigated by conducting laboratory experiments with animal models. Thus, we sought to investigate the potential neuroprotective effect of physical exercise training in striatum of mice exposed to 6-OHDA. For this purpose, in this study we verified if a swimming training (ST) program could reverted behavior alterations (depression, memory and coordination activity) induced by injection of 6-OHDA. In addition, we investigated the potential protective effect of swimming exercise training against stress

oxidative (reactive species (RS) levels and activities of catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR)), neurochemical alterations (DA, homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)) and neuroinflammation (interleukin-1 beta (IL-1 β)) induced by injection of 6-OHDA in striatum in mice.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Experiments were performed using male C57B/6J mice (20-30g, 90 days old). Animals were maintained at 22-25°C with free access to water and food, under a 12:12h light/dark cycle, with lights on at 7:00 a.m. All manipulations were carried out during light phase on the day. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. The procedures of this study were conducted according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animals Resources and with the approval of Ethical Committee for Animal Use (CEUA protocol # 038/2012).

2.2 Experimental design

Mice were randomly assigned into four groups (n=10 per group): (1) sedentary/ vehicle; (2) sedentary/ 6-OHDA; (3) exercise/ vehicle and (4) exercise/ 6-OHDA. In this experimental design (**fig. 1**), exercise groups were submitted to swimming training for 4 weeks with a progressive increase time and constant intensity. Sedentary groups were maintained in physical inactivity. After 24h of last bout of 2 weeks adaptation training, mice received stereotaxic surgery injection of 6-OHDA or vehicle. Four days after stereotaxic surgery injection, start of ST for 4 weeks and after day mice underwent cognitive behavioral tests for 3 days and, finally, submitted to euthanasia. The striatum and quadriceps femoris muscle were removed for assays.

2.3 Swimming training (ST) protocol

Mice in the exercise groups were submitted to 4-week ST program, adapted from Huang et al. 2010. Before 2-week of stereotaxic surgery, mice were acclimatized to the unfamiliar activity (swimming adaption period-SAP) in 250-L water-filled tank with the temperature kept at 31° \pm 2°C, in order to decrease the stress of swimming activity. In the SAP, animals could swim or stand in the tank with water depth of 5cm.

In the beginning of the second week, water deep was increased to 20cm, so that the hind limbs of the animals could not reach the bottom of the tank. Progressively, larger weights were attached to the proximal portions of animal's tails in order to increase the exercise intensity; the weights were 2%, in correspondence to body weight (BW). This intensity is considered below to anaerobic threshold for swimming training, in which was demonstrated by literature that workloads of up to 6% BW for rats (Gobatto et al. (2001) and 4% BW for mice (Almeida et al., 2011) can be considered 'sub-threshold' and is indicated to improvement of aerobic capacity (Gobatto et al., 2001). The ST bouts were performed five times per week, and animals swam individually in group of 10 animals. After each daily ST bouts, animals were towel dried and placed near a heater until the hair dried.

2.4 Stereotaxic surgery injection of 6-OHDA

Surgery was performed under anesthesia with 10 mL/kg of 1% ketamine (Bela-Pharm, Vechta, Germany) and 0.2% xylazine (Bayer HealthCare, Leverkusen, Germany). 6-OHDA (Sigma; 5 µg in 2 µL of 0.9% NaCl with 0.2 µg/IL ascorbic acid) was injected slowly (0.5 µL/min) into the right striatum (0.9 mm anterior and 1.8 mm lateral from bregma, 3.0 mm ventral from the dura). After the injection, the syringe was kept for additional 3 min in the brain, before it was slowly retracted. Controls were vehicle-injected (sham-OP) (Carlsson et al., 2011).

2.5 Behavioral assessment

2.5.1 Open-field test (OFT)

The animals were submitted individually for a period of 5 minutes to an OFT (Insight model EP 154C) 24 hours after pretreatment. The parameters observed included: distance (unit: mm), velocity (mm/s) and the number of rearing occurrences (Prut and Belzung, 2003).

2.5.2 Rota rod test

Motor coordination activity was evaluated using the rota rod test (Dunham and Miya, 1957) with minor alterations (Godoy et al., 2004). The apparatus consisted of a bar (3.7 cm in diameter) divided into 3 separate compartments, placed at a 25 cm height and rotating at a fixed velocity of 8 rpm. Twenty-four hours before testing, all animals

were submitted to a training session until they could remain in the apparatus for 120 s without falling.

2.5.3 Tail suspension test (TST)

Antidepressant-like effect was measured using the tail suspension test (Steru et al., 1985), with minor alterations (Souza et al., 2013). Mice were suspended by their tail using adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail and hung approximately 30 cm above the table. The animals were suspended for a period of 6 min, and the duration of immobility was scored manually during the last 4 min interval of the test (activity in the first 2 min was discarded because animals predominantly try to escape during this period). Mice were considered immobile only when they hung passively.

2.5.4 Object recognition test (ORT)

In this ORT mice were placed in an open box (similar to OFT) in order to evaluate the preference for a novel object, where the short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) could be assayed. The ORT was performed as described by Ennaceur and Delacour (1988) with some modifications.

Mice were allowed to explore two identical objects (sample phase) for 5 min and then returned to their home cage. To evaluate the short-term memory (STM), mice were returned to the open box, after a delay of 90 min, where they were exposed to two different objects (test phase), one identical to the one previously encountered in the sample phase, therefore now familiar, and the other is novel. The animals were allowed to explore both objects for more 5 min. After each trial, box and objects were cleaned with 70% ethanol. To evaluate the long-term memory (LTM), mice were tested in same conditions with a delay of 24h after sample phase.

The positions of the objects in the test and the objects used as novel or familiar were counterbalanced between the animals. Exploratory behavior was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Any other behavior, such as sitting on or turning around the object was not considered as exploration. The amount of time each animal spent actively investigating the objects was manually scored and discrimination index was calculated as the time exploring novel or familiar object divided by the total time spent exploring both objects.

2.6 Tissue preparation

After behavioral tests, mice were euthanized with barbiturate overdose (pentobarbital sodium 150mg/kg; i.p. route). Striatum were removed and rapidly homogenized in 50mM Tris-Cl, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 2,400×g for 15 min at 4 °C and a low-speed supernatant fraction (S₁) was used for assays. Quadriceps femoris muscle was removed and stored at -80°C for determination of activities of citrate synthase ((CS) indicator of oxidative muscle capacity), in order to determine the efficacy of exercise protocol.

2.7 Biochemical Determinations

2.7.1 Citrate synthase (CS) activity

CS activity was measured from total quadriceps femoris using commercially citrate synthase activity assay kit (Sigma Aldrich). Briefly, muscle tissue from each animal was homogenized in an extraction buffer (50 mM Tris-Hcl and 1 mM EDTA, pH 7.4). After centrifugation at 13,000 rpm for 1min at 4°C, aliquots of supernatants were used for the measurement of the enzyme activity. The activity of CS was expressed as units/mg protein.

2.7.2 Reactive species (RS) levels

To determine RS levels, S₁ (fresh preparation) was diluted (1:10) in 50mM Tris-Hcl (pH 7.4) and incubated with 10 µl of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA; 1mM), at 37°C for 30 min. The RS levels were determined by a spectrofluorimetric method, using DCHF-DA assay, as described by Loetchutinat et al. (2005). The DCHF-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form nonfluorescent DCFH, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of ROS. DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of RS that is formed. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 30 min after the addition of DCHF-DA to the medium. The RS levels were expressed as arbitrary unit (AU).

2.7.3 Interleukin-1 beta (IL-1β)

Levels of IL-1β in the striatum were determined using commercially available ELISA assays, following the instructions supplied by the manufacturer (DuoSet Kits, R&D Systems; Minneapolis). Results are shown as pg/mg tissue.

2.7.4 Catalase (CAT) activity

CAT activity in S₁ was assayed spectrophotometrically by the method proposed by Aebi (1984), which involves monitoring the disappearance of H₂O₂ in the presence of S₁ at 240 nm. Enzymatic reaction was initiated by adding S₁ and the substrate H₂O₂ (0.3 mM) in a medium containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required for monitoring the disappearance of H₂O₂. The enzymatic activity was expressed as Units (U)/mg protein (1U decomposes 1 μmol H₂O₂/min at pH 7 at 25 °C).

2.7.5 Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed through the conjugation of GSH with CDNB at 340 nm as described by Habig and Jakoby (1981). An aliquot of S₁ was added in a medium containing 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4). After that, 100 mM CDNB and GSH were added to the medium. CDNB was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein.

2.7.6 Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity in S₁ was assayed spectrophotometrically by the method described by Wendel (1981), through the GSH/NADPH/glutathione reductase system, by the dismutation of H₂O₂ at 340 nm. S₁ was added to the medium containing GSH/NADPH/glutathione reductase system and the enzymatic reaction was initiated by adding H₂O₂ (4 mM). In this assay, the enzyme activity was indirectly measured by means of NADPH decay. H₂O₂ is reduced and generates GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by glutathione reductase present in the assay media at the expenses of NADPH. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

2.7.7 Glutathione reductase (GR) activity

GR activity was determined spectrophotometrically as described by Calberg and Mannervick (1985). In this assay, GSSG is reduced by GR at the expense of NADPH consumption, which was followed at 340 nm. GR activity is proportional to NADPH decay. An aliquot of S₁ was added in the system containing 0.15 M potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1.5 mM EDTA, 0.15 mM NADPH. After the basal reading,

the substrate (GSSG 20 mM) was added. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

2.7.8 DA, DOPAC and HVA levels

Striatal tissues were homogenized with 300 μ L of 200 mM ice-cold perchloric acid containing 10 mM disodium EDTA. After centrifugation (10000g for 10 min at 4 °C), the supernatant was filtered (pore size, 0.45 μ m) and then injected directly into an HPLC system (Shimadzu; Kyoto, Japan) with an electrochemical detector (ECD; Eicom, Kyoto, Japan). The appendant potential of the ECD (carbon electrode vs. Ag/AgCl reference electrode) was set at 700 mV. The analytic column was a TSKgel Super-ODS (4.6 mm I.D. 9 100 mm; Tosoh, Tokyo, Japan), and the mobile phase consisted of 0.1 M citrate-sodium acetate buffer (pH 3.9) containing methanol (18%, v/v), disodium EDTA (4 mg/l), and sodium octanesulfonate (0.8 mM) (Ferraz et al., 2008).

2.8 Protein determination

Protein content was measured colorimetrically according to the method of Bradford (1976) and bovine serum albumin (1 mg/ml) was used as standard.

2.9 Statistical analysis

Results were presented as means \pm S.E.M. Comparisons between experimental and control groups were performed by one-way (exercise or 6-OHDA = independent variable) or two-way ANOVA (6-OHDA \times exercise treatments = independent variables) followed by Newman-Keuls test when appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant. All tests and plotting graphics were executed using the GraphPad prism 5 software (San Diego, CA, U.S.A.).

3. Results

3.1 Behavioural assessment

3.1.1 Locomotor activity in the OFT

Two-way ANOVA revealed that number of rearing in OFT was not changed significantly by 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,36} = 0.15$; $p = 0.69$), exercise ($F_{1,36} = 4.61$; $p = 0.08$) and 6-OHDA ($F_{1,36} = 0.01$; $p = 0.98$) (**table 1**).

Two-way ANOVA revealed that total distance in OFT was not changed significantly by 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,36} = 2.25$; $p = 0.24$), exercise ($F_{1,36} = 0.06$; $p = 0.80$) and 6-OHDA ($F_{1,36} = 2.39$; $p = 0.14$) (**table 1**).

Statistical analysis of the velocity performed in OFT was not changed significantly by 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,36} = 3.23$; $p = 0.08$), exercise ($F_{1,36} = 0.32$; $p = 0.57$] and 6-OHDA ($F_{1,36} = 0.13$; $p = 0.70$) (**table 1**).

3.1.2 Coordination activity in rota rod test

Two-way ANOVA revealed that latency to fall in rota rod test was changed significantly by 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,36} = 11.64$; $p = 0.01$), but not by exercise ($F_{1,36} = 2.71$; $p = 0.10$) and 6-OHDA ($F_{1,36} = 2.56$; $p = 0.11$) (**table 1**). Post hoc comparisons demonstrated that animals in the sedentary/6-OHDA group showed a reduction in latency to fall in rota rod test when compared to that of animals in vehicle/sedentary group. Physical exercise protected against impairment in rota rod test caused by 6-OHDA.

Statistical analysis of the falls number in rota rod test was not changed significantly by 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,36} = 2.82$; $p = 0.10$), exercise ($F_{1,36} = 1.59$; $p = 0.21$] and 6-OHDA ($F_{1,36} = 0.05$; $p = 0.82$) (**table 1**).

3.1.3 Depressive-like behavior in the TST

Two-way ANOVA of depressive-like behavior in the TST revealed a significant 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,36} = 5.43$; $p = 0.02$) and a main effect of exercise ($F_{1,36} = 5.34$; $p = 0.02$] and 6-OHDA ($F_{1,36} = 4.31$; $p = 0.02$) (**fig. 2**). Post hoc comparisons demonstrated that animals in the 6-OHDA/sedentary group showed an increase in immobility time when compared to that of animals in vehicle/sedentary group, exhibiting 6-OHDA induced depressive-like behavior in the TST. ST protected against increase in immobility time in the TST caused by 6-OHDA.

3.1.4 Short-term memory (STM) in ORT

Two-way ANOVA of cognitive performance in the ORT did not reveal a significant 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,36} = 0.54$; $p = 0.47$), exercise factor ($F_{1,36} = 0.07$; $p = 0.79$] and 6-OHDA factor ($F_{1,36} = 0.62$; $p = 0.44$) (**fig. 3A**).

3.1.5 Long-term memory in ORT

Statistical analysis of cognitive performance in the ORT revealed a significant 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,36} = 33.52$; $p = 0.01$) and a main effect of 6-OHDA ($F_{1,36} = 68.43$; $p < 0.05$), but not of exercise ($F_{1,36} = 3.13$; $p = 0.29$) (**fig. 3B**). Post hoc comparisons demonstrated that injection of 6-OHDA/sedentary reduced recognition index in sedentary mice, promoting impairment on LTM. Exercise prevented against LTM impairment elicited by 6-OHDA, improving the recognition index in LTM.

3.2 Assessment of muscle oxidative metabolism

The adaptation of skeletal muscle oxidative capacity is considered a good mark of exercise training efficacy (Wibom et al. 1992). Citrate synthase (CS) activity is routinely used as a marker of aerobic capacity and mitochondrial density in skeletal muscle in experiments with rodents (Mann et al., 2010) and humans (Leek et al. 2001; Love et al. 2011). In light of this, the activities of CS and mitochondrial respiratory system complex were assayed in mitochondrial isolated from quadriceps femoris in order to assay the efficacy of exercise training protocol. One-way ANOVA revealed that exercise increased significantly CS ($F_{1,20} = 25.98$, $p < 0.05$; **fig. 4A**) activities in trained animals in relation to sedentary animals.

3.3 Biomarkers of oxidative stress, neuroinflammation and neurochemical alterations

3.3.1 RS levels

Two-way ANOVA of RS levels in striatum of mice demonstrated a significant 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,36} = 9.91$; $p = 0.01$) and a main effect of exercise ($F_{1,36} = 4.71$; $p = 0.04$) and 6-OHDA ($F_{1,36} = 38.86$; $p = 0.01$). Post hoc comparisons revealed that 6-OHDA significantly increased RS levels in striatum of mice. Physical exercise prevented the increase of RS levels caused by 6-OHDA in striatum of mice (**fig. 4B**).

3.3.2 IL-1 β (proinflammatory cytokines) levels

Two-way ANOVA of IL-1 β levels in striatum of mice demonstrated a significant 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,24} = 14.76$; $p = 0.01$) and a main effect of exercise ($F_{1,24} = 8.07$; $p = 0.01$) and 6-OHDA ($F_{1,24} = 66.85$; $p = 0.01$). Post hoc comparisons revealed that 6-OHDA significantly increased IL-1 β levels in striatum of

sedentary mice. Exercise prevented the increase of IL-1 β levels caused by 6-OHDA in striatum of mice (**fig. 4C**).

3.3.3 DA, DOPAC and HVA levels

Statistical analysis of DA levels in striatum revealed a significant 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,24} = 22.39$; $p = 0.01$) and a main effect of 6-OHDA ($F_{1,24} = 39.30$; $p = 0.01$). Post hoc comparisons demonstrated that 6-OHDA significantly decreased DA levels in striatum of sedentary mice. Exercise prevented the decrease of DA levels caused by 6-OHDA in striatum of mice (**fig. 5A**).

Two-way ANOVA of DOPAC levels in striatum yielded a significant 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,24} = 5.09$; $p = 0.03$) and a main effect of 6-OHDA ($F_{1,24} = 22.92$; $p = 0.01$) (**fig. 5B**). Post hoc comparisons demonstrated that 6-OHDA significantly decreased DOPAC levels in striatum of sedentary mice. Exercise significantly restored DOPAC levels in striatum of mice in exercise/6-OHDA group.

A significant 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,24} = 23.03$; $p = 0.01$) and a main effect of exercise ($F_{1,24} = 21.44$; $p = 0.01$) and 6-OHDA ($F_{1,24} = 63.38$; $p = 0.01$) in striatum HVA levels in striatum of mice was observed (**fig. 5C**). Post hoc comparisons demonstrated that 6-OHDA significantly decreased HVA levels in striatum of sedentary mice. Physical exercise significantly restored HVA levels in striatum of exercise/6-OHDA mice.

3.3.4 CAT activity

Two-way ANOVA revealed that CAT activity in striatum of mice was not changed significantly by 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,24} = 0.13$; $p = 0.71$), exercise ($F_{1,24} = 0.44$; $p = 0.51$) and 6-OHDA ($F_{1,24} = 0.15$; $p = 0.70$) (**table 2**).

3.3.5 GST activity

Two-way ANOVA of GST activity in striatum demonstrated a significant 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,24} = 26.86$; $p = 0.01$) and a main effect of exercise ($F_{1,24} = 46.42$; $p = 0.01$) and 6-OHDA ($F_{1,24} = 53.81$; $p = 0.01$). Post hoc comparisons revealed that 6-OHDA significantly increased GST activity in striatum of sedentary mice. Exercise prevented the increase of GST activity caused by 6-OHDA in hippocampus of mice (**table 2**).

3.3.6 GPx activity

Statistical analysis of GPx activity in striatum revealed a significant a main effect exercise ($F_{1,24} = 19.70$; $p = 0.01$) and of 6-OHDA ($F_{1,24} = 45.74$; $p = 0.01$). Post hoc comparisons demonstrated that 6-OHDA significantly inhibited GPx activity in striatum of sedentary mice. Physical exercise prevented the inhibition of GPx activity caused by 6-OHDA in striatum of mice (**table 2**).

3.3.7 GR activity

Two-way ANOVA of GR activity in hippocampus demonstrated a significant 6-OHDA \times exercise interaction ($F_{1,24} = 8.06$; $p = 0.01$) and a main effect of 6-OHDA ($F_{1,24} = 5.85$; $p = 0.02$). Post hoc comparisons revealed that 6-OHDA significantly increased GR activity in striatum of sedentary mice. Exercise prevented the increase of GR activity caused by 6-OHDA in striatum of mice (**table 2**).

4. Discussion

Recent studies have demonstrated that exercise improves motor function in PD patients and in animal models of PD (Tillerson et al., 2003; Fisher et al., 2004; Petzinger et al., 2007). Exercise also improves neuropsychiatric symptoms in non-PD patients and in mice (Babyak et al., 2000; Barbour et al., 2005; De Moor et al., 2006; Duman et al., 2008). The purpose of this study was to investigate the impact of exercise on an experimental model of PD, induced by 6-OHDA in mice, with a moderate level of neurodegenerative disease and to explore possible mechanisms of exercise induced neuroprotection. For 4 weeks after injection of 6-OHDA or saline, mice were subject to ST or remained sedentary. With this protocol, we demonstrated that ST protected striatum of mice against oxidative stress, neuroinflammation and the decrease of DA, DOPAC and HVA levels caused by 6-OHDA exposure. The neuroprotective impact of exercise was also confirmed by behavioral improvement; thus, the exercise group performed better than the sedentary in cognitive impairment, depressive-like test and coordination activity.

ST is considered an effective exercise protocol to enhance muscle oxidative capacity and promotes adaptation to physical training in rodents similar to those observed in human beings. Likewise, swim is a natural ability of rodents and ST lacks the presence of electric stimulus as stress factor (Contarteze et al. 2008). ST is more suitable for animal models with neurodegenerative lesions and with partial DA

depletion. Such animal models are suitable for drug discovery studies, and therefore, swim-test can serve as a valuable tool to assess motor behavioural aberration in neuroprotective studies (Haobam et al., 2005).

Depression is among the most common psychiatric conditions accompanying PD. Indeed, depending on the criteria used, depression can affect 10–45% of PD patients (Noyce et al., 2012). Furthermore, it has been shown that depression may largely precede the onset of motor symptoms of PD (Nilsson et al., 2001; Noyce et al., 2012). It was found in the TST, one of the tests most commonly used to evaluate depression-like behavior in laboratory rodents (Cryan et al., 2005), are in line with the clinical data (Pollak et al., 2010). The findings herein indicated that infusions of the neurotoxin 6-OHDA was able to produce depressive-like behaviors assessed through the TST. Furthermore, such an alteration in TST has been found 5 weeks after the lesion, when no alteration is as yet present according to locomotor activity analysis. Although very subtle motor impairment not revealed by the latter analysis cannot be ruled out, these results suggest that the appearance of depression-like behavior precedes that of motor symptoms. In addition, the alterations in dopaminergic system suggest, therefore, that neurotransmitter systems play an important role in depressive-like behaviors in the current model tested, further supporting the involvement of these neurotransmitter systems in PD-related depression (Schrag, 2004; Zhang et al., 2011). This result supports our point of view that 6-OHDA subjects were enduring a depression-like process, similar to what was previously reported by other groups (Branchi et al., 2008; Tadaiesky et al., 2008; Santiago et al., 2010). Our results demonstrated that exercise group obtained less immobility time than the 6-OHDA/sedentary group, showing that ST had antidepressant – like effect in this model of PD induced by 6-OHDA in mice. This antidepressant-like activity of ST in a PD model was correlated with neurochemical and neuroinflammatory alterations at the striatal level. The present study also revealed the neuroprotective potential of ST against 6-OHDA –induced Parkinson-like symptoms in mice. This result demonstrated that challenge with injection of 6-OHDA resulted in the behavioral alteration (rota rod performance in the latency to fall) was reverted by ST in mice.

Besides emotional deficits presented in PD patients, PD seems to produce cognitive deficits, especially in procedural memory. The striatum has been the main area implicated in procedural learning dysfunctions (Saint-Cyr et al., 1988; Tadaiesky et al., 2008), consistent with earlier studies reporting that PD models impair mice

performance in the ORT (De Leonibus et al., 2007; Magen et al., 2012). To assess the cognitive behaviour of mice we resort to the object recognition test (ORT). This test is considered well-suited to study the effect of exercise on cognition and it does not involve strong aversive elements such as foot shock delivered during fear conditioning or food deprivation (Hopkins and Bucci 2010). ORT exploits the natural tendency of animals to explore novel stimuli in preference to familiar stimuli, and it is used to evaluate declarative memory. Our data demonstrated that injection of 6-OHDA induced long-term memory (LTM) impairment in sedentary mice revealed by the reduction of recognition index in ORT. Importantly, the percent of striatal DA, DOPAC and HVA depletion and increase of stress oxidative and neuroinflammation observed in this study was similar to previous studies showing deficits in memory tasks (Miyoshi et al., 2002; Ferro et al., 2005; De Leonibus et al., 2009). As for the cognitive deficits found in this test, our findings support the hypothesis of an involvement of striatal DA, DOPAC and HVA levels, antioxidant deficits and neuroinflammation induced by 6-OHDA in memory in this model of PD. In our study, ST protected against cognitive impairment induced by 6-OHDA, preserving LTM, revealed by preventing reduction of recognition index in ORT due mechanisms such as antioxidant, anti-inflammatory and DA-enhancing.

In this study, 6-OHDA infusion caused an overproduction of free radicals which, in turn, caused oxidative damages to membrane lipids and protein levels, and ultimately lead to a modification in activity of antioxidant enzymes. This oxidative neuronal damage in 6-OHDA-treated rodents is consistent with previous reports (Khan et al., 2012; Shobana et al., 2012). 6-OHDA is a selective catecholamine neurotoxin and could easily undergo autoxidation to yield hydrogen peroxide and superoxide radicals which take part in a secondary metal-catalyzed Haber-Weiss reaction producing hydroxyl free radicals (Opacka-Juffry et al., 1998). As a result, sedentary mice exposed to 6-OHDA had an inhibition of GPx activity and an increase of GR and GST activities and RS levels. Conversely, we demonstrated that the activity of CAT remained unaltered in all groups. In relation to CAT activity, this fact can be explained partly due to the lower levels of CAT naturally found in the brain (Aksu et al. 2009). We also demonstrated that ST for 4 weeks reverted the inhibition of the GPx activity and the increase in GR and GST activities and RS levels induced by 6-OHDA in striatum of mice. Thus, our study demonstrated that exercise may protect against this neurotoxic mechanism of 6-OHDA on cellular redox state of brain by modulated antioxidant enzymes.

The antioxidant protection of exercise is based on the hormetic principle. It means that low exposures to toxins and other stressors promote favorable organic adaptations, enhancing physiological performance and improving health (Ji et al. 2006). Thus, acute exposures to exercise are inducers of oxidative stress, where chronic exposure is required for the upregulation of antioxidant defenses. Indeed, the generation of RS is enhanced during exercise mainly due to an increase in the oxygen consumption, to reductive stress coming from the cyclic events of muscle contraction (ischemia-reperfusion), and to the activation of the xanthine oxidase (Bloomer and Goldfarb 2004). Therefore, RS play an important role in the mechanism whereby exercise confers antioxidant protection (Ji et al. 2006).

Neuroinflammation is a key process in the neuropathogenesis of PD and involves the release from the activated glia of a number of neurotoxic molecules such as RS and cytokines (Barnum and Tansey, 2010; Hirsch et al. 2012). Excessive levels of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor – alfa (TNF- α) and IL-1 β are apt to induce neuronal damage through a variety of mechanisms in PD, including the generation of free oxygen radicals (Koprach et al., 2008) and directly bind to their receptors on the cell surfaces on dopaminergic neurons (Phani et al., 2012). Under physiological conditions these cytokines are expressed at low levels in the brain, but they can be induced by insults resulting in neurodegeneration (Zhao et al., 2007; Koprach et al., 2008). Our data clearly demonstrated that injection of 6-OHDA- induced an expressive rise in IL-1 β levels in striatum of sedentary mice. In this study, we found that ST protected against this 6-OHDA-induced proinflammatory effect reinforcing reports that have shown anti-inflammatory effects of exercise in this PD model (Mabandla and Russell, 2010; Tajiri et al., 2010; Dimatelis et al., 2012).

The measurement of monoamine neurotransmitters in the basal ganglia serves as an important method to determine whether or not a particular drug has a therapeutic effect on dopaminergic neurons (Moore et al., 2005). The activities of dopaminergic neurons can thus be inferred by determining the levels of DA, DOPAC and HVA in the brain or in the cerebrospinal fluid (Moore et al., 2005). To this end, we performed HPLC ECD to detect monoamine neurotransmitters in the striatum of mice, and found that levels of DA, DOPAC and HVA were significantly decreased following 6-OHDA exposure, which is similar to previous reports (Glajch et al., 2012; Heuer et al., 2012; Shobana et al., 2012). We can inferred from the above study that ST may inhibit the 6-OHDA-induced catecholamine neurotoxicity and maintain the concentration of DA and

its metabolites at normality or close to normality. Therefore, ST appears to act, in this PD model induced by 6-OHDA, via antioxidant and anti-inflammatory and DA-enhancing mechanisms that rescue the compromised cells in striatum of mice.

The present study demonstrated that an 4-week ST with low intensity was effective in attenuating the following impairments resulting from 6-OHDA exposure in mice: (1) depressive-like behavior in TST; (2) increase in number of falls in rota rod test; (3) impairment on LTM in the ORT; (3) increased RS and IL-1 β levels; (4) inhibition of the GPx activity and rise the GR and GST activities and (5) decrease the levels of DA, DOPAC and HVA. In view of our results, we indicated that ST acting as a neuroprotective agent analyzing behavioral, neurochemical and biochemical parameters. The mechanisms involved in this study are the modulation of GPx, GR and GST activities and IL-1 β level in a PD model induced by 6-OHDA in mice, and hence protecting against the decrease of DA, DOPAC and HVA levels in striatum of mice. These findings reinforce that one of the effects induced by exercise on neurodegenerative disease, such as PD, is due to antioxidant and anti-inflammatory properties.

In conclusion, we suggest that exercise attenuates cognitive and motor declines, depression, oxidative stress, and neuroinflammation induced by 6-OHDA in mice supporting the hypothesis that exercise can be used as a non-pharmacological tool to reduce the symptoms of PD.

Acknowledgments

ATRG, LCS, CBF, LDF and MGG are recipients of PBDA/UNIPAMPA, CAPES, FAPERGS, CNPq and PBDA/UNIPAMPA fellowships, respectively.

Legends of figures

Fig.1. Experimental study design.

Fig.2. Effect of 4-weeks ST and stereotax surgery injection 6-OHDA on TST. Values are mean \pm S.E.M. (n=10 per group). ^b P<0,05 when compared sedentary/6-OHDA with sedentary/vehicle. ^d P<0.05 when compared exercise/6-OHDA with sedentary/6-OHDA (two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test).

Fig.3. Effect of 4-weeks ST and stereotax surgery injection 6-OHDA on STM (A) and LTM. Values are mean \pm S.E.M. (n=10 per group). ^b P<0,05 when compared sedentary/6-OHDA with sedentary/vehicle. ^d P<0.05 when compared exercise/6-OHDA with sedentary/6-OHDA (two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test).

Fig.4. Effect of 4-weeks ST and stereotax surgery injection 6-OHDA on CS activity in quadriceps femoris muscle (A), RS (B) and IL-1 β levels (C) in striatum of mice. Values are mean \pm S.E.M. (n=10 per group). ^a P<0,05 when compared sedentary/vehicle with exercise/vehicle. ^b P<0,05 when compared sedentary/6-OHDA with sedentary/vehicle. ^d P<0.05 when compared exercise/6-OHDA with sedentary/6-OHDA. ^c P<0,05 when compared exercise/6-OHDA with sedentary/vehicle (two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test).

Fig. 5. Effect of 4-weeks ST and stereotax surgery injection 6-OHDA on DA (A), DOPAC (B) and HVA levels (C) in striatum of mice. Values are mean \pm S.E.M. (n=10 per group). ^b P<0,05 when compared sedentary/6-OHDA with sedentary/vehicle. ^d P<0.05 when compared exercise/6-OHDA with sedentary/6-OHDA. ^c P<0,05 when compared exercise/6-OHDA with sedentary/vehicle (two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test).

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105, 121-126.
- Ahmad, S., Khan, M.B., Hoda, M.N., Bhatia, K., Haque, R., Fazili, I.S., Jamal, A., Khan, J.S., Katare, D.P., 2012. Neuroprotective effect of sesame seed oil in 6-hydroxydopamine induced neurotoxicity in mice model: cellular, biochemical and neurochemical evidence. *Neurochem Res* 37, 516-526.
- Aksu, I., Topcu, A., Camsari, U.M., Acikgoz, O., 2009. Effect of acute and chronic exercise on oxidant-antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. *Neurosci Lett* 452, 281-285.
- Almeida, W.S., Lima, L.C., Cunha, V.N., Cunha, R.R., Araújo, R.C., Barros, C.C., Simões, H.G., Campbell, C.S., 2011. Assessment of aerobic capacity during swimming exercise in ob/ob mice. *Cell Biochem Funct* 29, 666-672.
- Ayán, C., Cancela, J., 2012. Feasibility of 2 different water-based exercise training programs in patients with Parkinson's disease: a pilot study. *Arch Phys Med Rehabil* 93, 1709-1714.

- Babyak, M., Blumenthal, J.A., Herman, S., Khatri, P., Doraiswamy, M., Moore, K., 2000. Exercise treatment for major depression: maintenance of therapeutic benefit at 10 months. *Psychosom Med* 62, 633-638.
- Barbour, K.A., Blumenthal, J.A., 2005. Exercise training and depression in older adults. *Neurobiol Aging* 26, 119-123.
- Barnum, C.J., Tansey, M.G., 2010. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 184, 113-132.
- Bloomer, R.J., Goldfarb, A.H., 2004. Anaerobic exercise and oxidative stress: A review. *Can J Appl Physiol* 29, 245-263.
- Boveris, A., Navarro, A., 2008. Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med* 44, 224-229.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Branchi, I., D'Andrea, I., Armida, M., Cassano, T., Pèzzola, A., Potenza, R.L., Morgese, M.G., Popoli, P., Alleva, E., 2008. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *J Neurosci Res* 86, 2050-2061.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods Enzymol* 113, 484-490.
- Carlsson, T., Schindler, F.R., Höllerhage, M., Depboylu, C., Arias-Carrión, O., Schnurrbusch, S., Rösler, T.W., Wozny, W., Schwall, G.P., Groebe, K., Oertel, W.H., Brundin, P., Schratzenholz, A., Höglinger, G.U., 2011. Systemic administration of neuregulin-1 β 1 protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 117, 1066-1074.
- Conley, K.E., Jubrias, S.A., Amara, C.E., Marcinek, D.J., 2007. Mitochondrial dysfunction: impact on exercise performance and cellular aging. *Exerc Sport Sci Rev* 35, 43-49.
- Contarteze, R.V.L., Machado, F.D.B., Gobatto, C.A., De Mello, M.A.R., 2008. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 151, 415-422.
- Cryan, J.F., Mombereau, C., Vassout, A., 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 29, 571-625.
- Dasuri, K., Zhang, L., Keller, J.N., 2012. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radic Biol Med* doi:pii: S0891-5849(12)01141-0. 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.016.
- De Leonibus, E., Managò, F., Giordani, F., Petrosino, F., Lopez, S., Oliverio, A., Amalric, M., Mele, A., 2009. Metabotropic glutamate receptors 5 blockade reverses spatial memory deficits in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology* 34, 729-738.
- De Leonibus, E., Pascucci, T., Lopez, S., Oliverio, A., Amalric, M., Mele, A., 2007. Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. *Psychopharmacology* 194, 517-525.

- De Moor, M.H., Beem, A.L., Stubbe, J.H., Boomsma, D.I., De Geus, E.J., 2006. Regular exercise, anxiety, depression and personality: a population-based study. *Prev Med* 42, 273-279.
- Dimatelis, J.J., Hendricks, S., Hsieh, J.H., Vlok, M.N., Bugarith, K., Daniels, W.M., Russell, V.A., 2012. Exercise partially reverses the effect of maternal separation on hippocampal proteins in 6-hydroxydopamine lesioned rat brain. *Exp Physiol* doi: 10.1113/expphysiol.2012.066720.
- Duman, C.H., Schlesinger, L., Russell, D.S., Duman, R.S., 2008. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. *Brain Res* 1199, 148-158.
- Dunham, N.W., Miya, T.S., 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc* 46, 209-209.
- Ellis, T., Cavanaugh, J.T., Earhart, G.M., Ford, M.P., Foreman, K.B., Fredman, L., Boudreau, J.K., Dibble, L.E., 2011. Factors associated with exercise behavior in people with Parkinson disease. *Phys Ther* 91, 1838-1848.
- Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. *Behav Brain Res* 31, 47-59.
- Ferraz, A.C., Matheussi, F., Szawka, R.E., Rizelio, V., Delattre, A.M., Rigon, P., Hermel, E.E.S., Xavier, L.L., Achaval, M., Anselmo-Franci, J.A., 2008. Evaluation of estrogen neuroprotective effect on nigrostriatal dopaminergic neurons following 6-OHDA injection into the substantia nigra pars compacta or medial forebrain bundle. *Neurochem Res* 33, 1238-1246.
- Ferro, M.M., Bellissimo, M.I., Anselmo-Franci, J.A., Angellucci, M.E., Canteras, N.S., Da Cunha, C., 2005. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods* 148, 78-87.
- Fisher, B.E., Petzinger, G.M., Nixon, K., Hogg, E., Bremmer, S., Meshul, C.K., 2004. Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse basal ganglia. *J Neurosci Res* 77, 378-390.
- Glajch, K.E., Fleming, S.M., Surmeier, D.J., Osten, P., 2012. Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res* 230, 309-316.
- Gobatto, C.A., De Mello, M.A., Sibuya, C.Y., De Azevedo, J.R., Dos Santos, L.A., Kokubun, E., 2001. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130, 21-27.
- Godoy, M.C., Figuera, M.R., Souza, F.R., Flores, A.E., Rubin, M.A., Oliveira, M.R., Zanatta, N., Martins, M.A., Bonacorso, H.G., Mello, C.F., 2004. Alpha 2-adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazolines, but not of dipyrone. *Eur J Pharmacol* 496, 93-97.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol* 77, 218-231.
- Haleagrahara, N., Siew, C.J., Mitra, N.K., Kumari, M., 2011. Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum. *Neurosci Lett* 500, 139-143.

- Haobam, R., Sindhu, K.M., Chandra, G., Mohanakumar, K.P., 2005. Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: a comparative study in two mouse strains. *Behav Brain Res* 8, 159-167.
- Heuer, A., Smith, G.A., Dunnett, S.B., 2012. Comparison of 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra and the medial forebrain bundle on a lateralised choice reaction time task in mice. *Eur J Neurosci* doi: 10.1111/ejn.12036.
- Hirsch, E.C., Vyas, S., Hunot, S., 2012. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 18, 210-212.
- Hopkins, M.E., Bucci, D.J., 2010. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-Induced improvement in object recognition memory. *Neurobiol learn mem* 94, 278-284.
- Huang, T.H., Hsieh, S.S., Liu, S.H., Chang, F.L., Lin, S.C., Yang, R.S., 2010. Swimming training increases the post-yield energy of bone in young male rats. *Calcif Tissue Int* 86, 142-153.
- Ji, L.L., Gomez-Cabrera, M.C., Vina, J., 2006. Exercise and hormesis activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann NY Acad Sci* 1067, 425-435.
- Kabuto, H., Yamanushi, T.T., 2011. Effects of zingerone [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone] and eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] on the pathological progress in the 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease mouse model. *Neurochem Res* 36, 2244-2249.
- Kara, B., Genc, A., Colakoglu, B.D., Cakmur, R., 2012. The effect of supervised exercises on static and dynamic balance in Parkinson's disease patients. *NeuroRehabilitation* 30, 351-357.
- Koprich, J.B., Reske-Nielsen, C., Mithal, P., Isacson, O., 2008. Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* 5, 8.
- Leek, B.T., Mudaliar, S.R., Henry, R., Mathieu-Costello, O., Richardson, R.S., 2001. Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, 441-447.
- Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J., Mankhetkorn, S., 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Rad Phys Chem* 72, 323-331.
- Mabandla, M.V., Russell, V.A., 2010. Voluntary exercise reduces the neurotoxic effects of 6-hydroxydopamine in maternally separated rats. *Behav Brain Res* 211, 16-22.
- Magen, I., Fleming, S.M., Zhu, C., Garcia, E.C., Cardiff, K.M., Dinh, D., De La Rosa, K., Sanchez, M., Torres, E.R., Masliah, E., Jentsch, J.D., Chesselet, M.F., 2012. Cognitive deficits in a mouse model of pre-manifest Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 35, 870-882.
- Mann, P.B., Jiang, W., Zhu, Z., Wolfe, P., McTiernan, A., Thompson, H.J. 2010. Wheel running, skeletal muscle aerobic capacity and 1-methyl-1-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis* 31, 1279-1283.
- Miyoshi, E., Wietzikoski, S., Camplessei, M., Silveira, R., Takahashi, R.N., Da Cunha, C., 2002. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version

of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. *Brain Res Bull* 58, 41-47.

Moore, D.J., West, A.B., Dawson, V.L., 2005. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 28, 57-87.

Nilsson, F.M., Kessing, L.V., Bolwig, T.G., 2001. Increased risk of developing Parkinson's disease for patients with major affective disorder: a register study. *Acta Psychiatr Scand* 104, 380-386.

Noyce, A.J., Bestwick, J.P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C.H., Giovannoni, G., Lees, A.J., Schrag, A., 2012. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol* doi: 10.1002/ana.23687.

Opacka-Juffry, J., Wilson, A.W., Blunt, S.B., 1998. Effects of pergolide treatment on in vivo hydroxyl free radical formation during infusion of 6-hydroxydopamine in rat striatum. *Brain Res* 810, 27-33.

Petzinger, G.M., Walsh, J.P., Akopian, G., Hogg, E., Abernathy, A., Arevalo, P., 2007. Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. *J Neurosci* 27, 5291-5300.

Phani, S., Loike, J.D., Przedborski, S., 2012. Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 18, 207-209.

Pollak, D.D., Rey, C.E., Monje, F.J., 2010. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. *Ann Med* 42, 252-264.

Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 463, 3-33.

Saint-Cyr, J.A., Taylor, A.E., Lang, A.E., 1988. Procedural learning and neostriatal dysfunction in man. *Brain* 111, 941-959.

Santiago, R.M., Barbieiro, J., Lima, M.M., Dombrowski, P.A., Andreatini, R., Vital, M.A., 2010. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34, 1104-1114.

Schrag A., 2004. Psychiatric aspects of Parkinson's disease-an update. *J Neurol* 251, 795-804.

Shobana, C., Kumar, R.R., Sumathi, T., 2012. Alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. protects against 6-hydroxydopamine-induced changes in behavioral and biochemical aspects: a pilot study. 32, 1099-1112.

Souza, L.C., de Gomes, M.G., Goes, A.T., Del Fabbro, L., Filho, C.B., Boeira, S.P., Jesse, C.R., 2013. Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT(1A) receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40, 103-109.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367-370.

Tadaiesky, M.T., Dombrowski, P.A., Figueiredo, C.P., Cargnin-Ferreira, E., Da Cunha, C., Takahashi, R.N., 2008. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 156, 830-840.

- Tajiri, N., Yasuhara, T., Shingo, T., Kondo, A., Yuan, W., Kadota, T., Wang, F., Baba, T., Tayra, J.T., Morimoto, T., Jing, M., Kikuchi, Y., Kuramoto, S., Agari, T., Miyoshi, Y., Fujino, H., Obata, F., Takeda, I., Furuta, T., Date, I., 2010. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. *Brain Res* 1310, 200-207.
- Tillerson, J.L., Caudle, W.M., Reverón, M.E., Miller, G.W., 2003. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 119, 899-911.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 177, 325-333.
- Wibom, R., Hultman, E., Johansson, M., Matherei, K., Constantin-Teodosiu, D., Schantz, P.G., 1992. Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. *J Appl Physiol* 73, 2004-2010.
- Zhang, X., Egeland, M., Svenningsson, P., 2011. Antidepressant-like properties of sarizotan in experimental Parkinsonism. *Psychopharmacology* 218, 621-634.
- Zhao, C., Ling, Z., Newman, M.B., Bhatia, A., Carvey, P.M., 2007. TNF-alpha knockout and minocycline treatment attenuates blood-brain barrier leakage in MPTP-treated mice. *Neurobiol Dis* 26, 36-46.

Figure 1

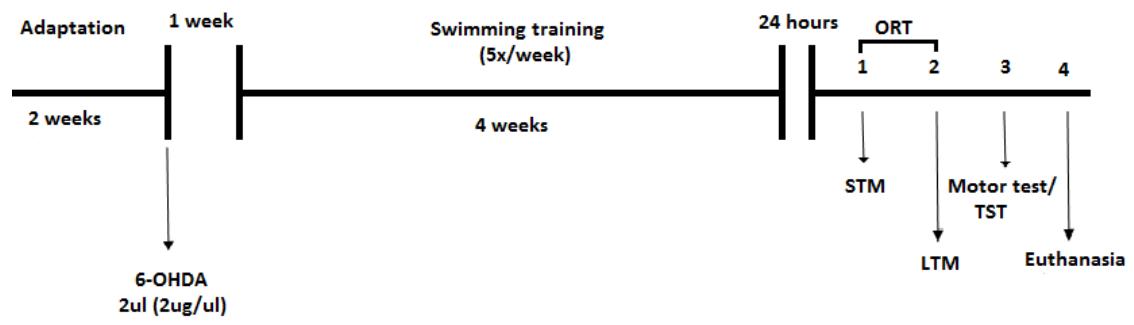


Figure 2

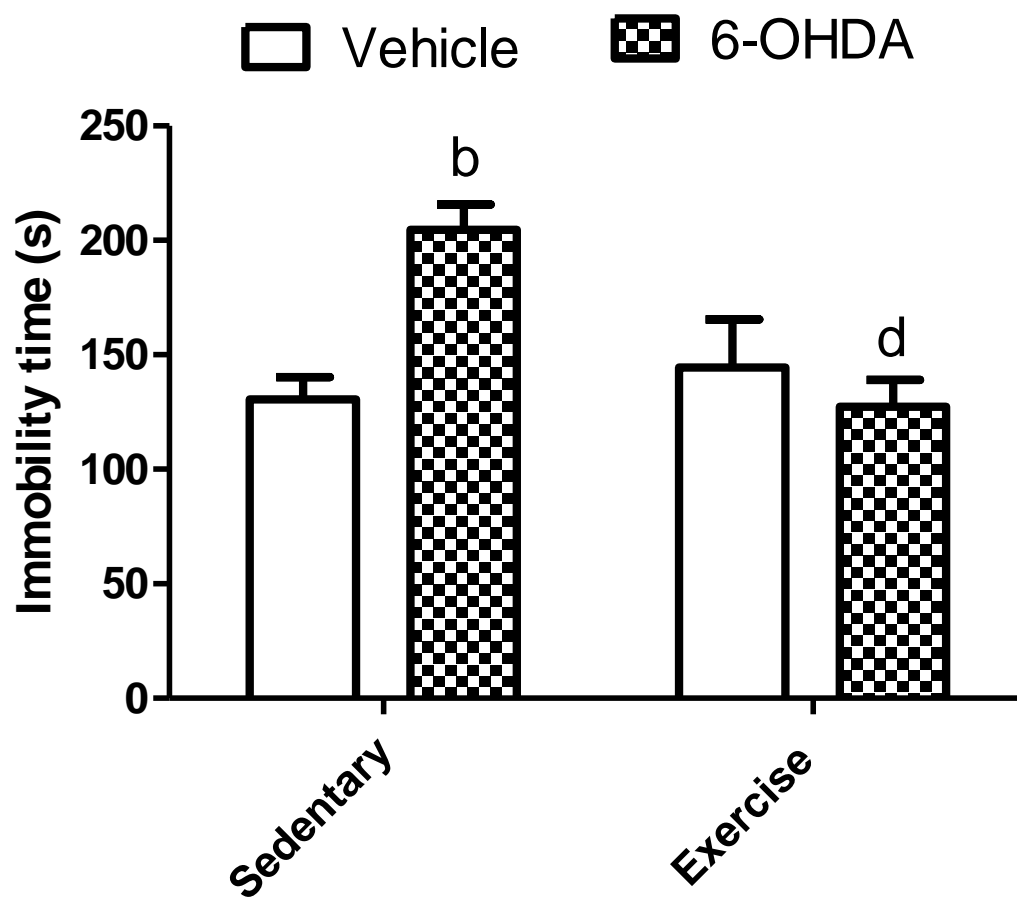


Figure 3

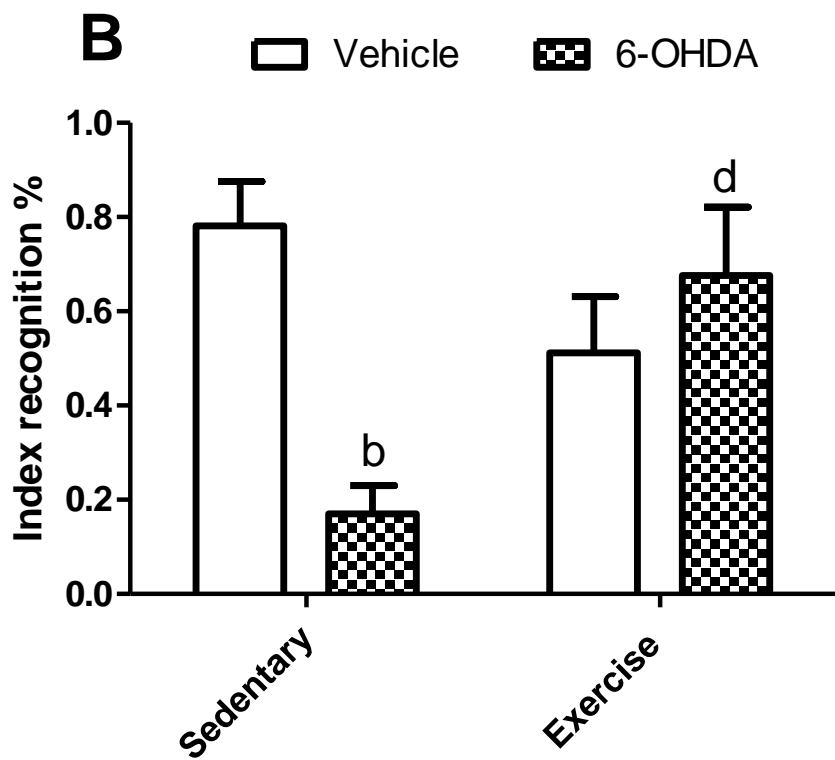
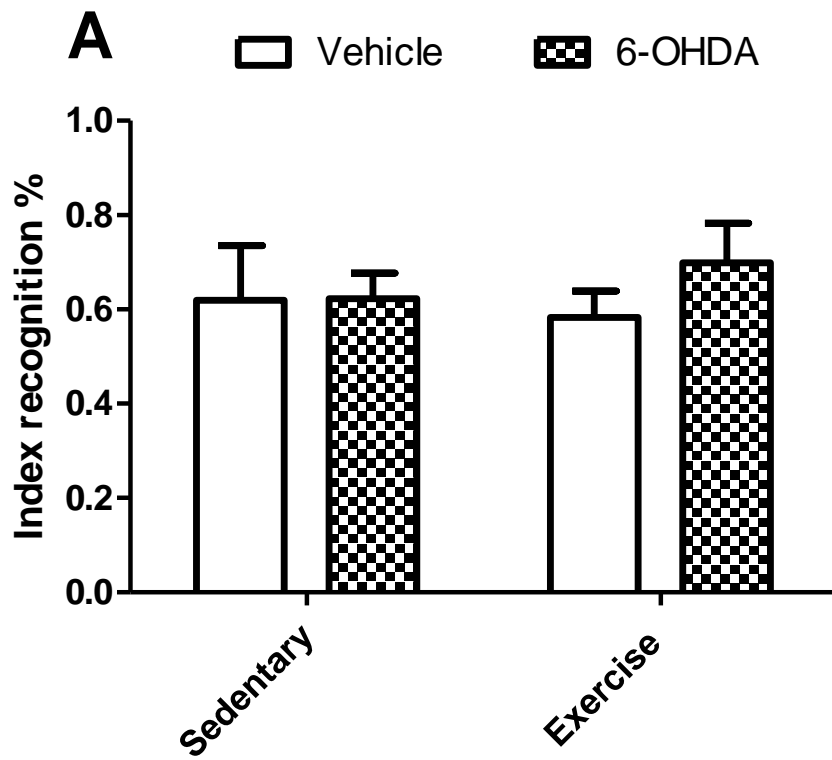


Figure 4

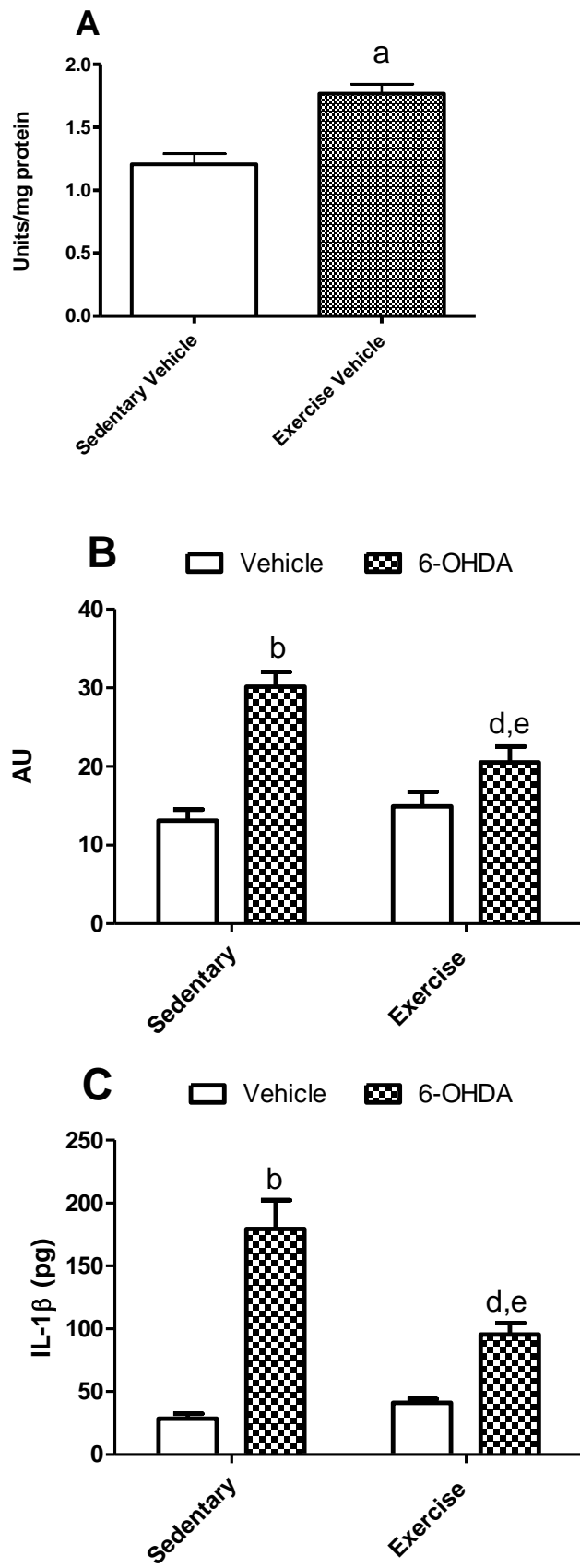


Figure 5

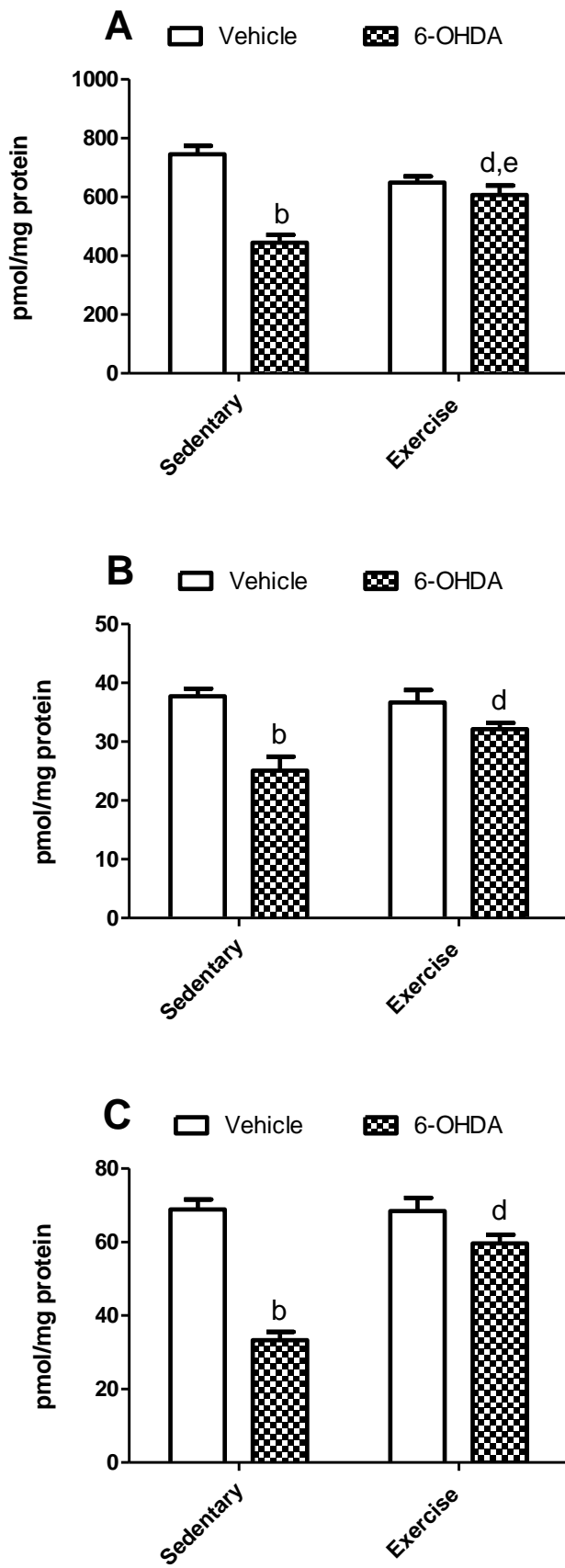


Table 1. Effect of 4-weeks ST and surgery injection 6-OHDA on number of rearing, distance, velocity, latency to fall of rod and falls number of mice.

Groups	Number of rearings ¹	Distance (mm) ¹	Velocity (mm/s) ¹	Latency to fall of rod ²	Falls number ²
Vehicle/Sedentary	11,9± 1,89	10920 ± 2675	37,2 ± 7,69	102,1± 7,80	1,4 ± 0,39
Vehicle/Exercise	14,8± 1,31	17180± 2792	60,7 ± 8,79	75,3 ± 11,86	1,6 ± 0,47
6-OHDA/Sedentary	11,2± 2,08	18300± 3133	59,0 ±10,46	57,8 ± 9,85 ^b	2,0 ± 0,44
6-OHDA/Exercise	15,5 ± 1,12	15280 ± 1785	44,8 ± 4,48	102,5 ± 6,27 ^d	0,8 ± 0,27

The values were analyzed by two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test, each value is expressed as the mean ± SD (n = 10 mice/group). ^b P<0,05 when compared sedentary/6-OHDA with sedentary/vehicle. ^d P<0.05 when compared exercise/6-OHDA with sedentary/6-OHDA. ¹Measured in the open-field test. ²Measured in the rotarod test.

Table 2. Effect of 4-weeks ST and surgery injection 6-OHDA on CAT, GST, GPx and GR activities in striatum of mice.

Groups	CAT	GST	GPx	GR
Vehicle/Sedentary	0,85 ± 0,19	30,1 ± 4,76	47,7 ± 2,78	30,9 ± 2,49
Vehicle/Exercise	0,65 ± 0,13	23,0 ± 2,24	54,4 ± 2,26	33,96 ± 2,65
6-OHDA/Sedentary	0,70 ± 0,16	86,3 ± 4,00 ^b	26,6 ± 2,31 ^b	45,6 ± 3,27 ^b
6-OHDA/Exercise	0,65 ± 0,31	27,6 ± 5,30 ^d	41,9 ± 2,55 ^{d,e}	32,79 ± 2,68 ^d

The values were analyzed by two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test, each value is expressed as the mean ± SD (n = 10 mice/group). CAT, GST, GPx and GR activities are expressed as units (U)/mg protein; nmol CDNB conjugated/min/mg protein; nmol NADPH/min/mg protein and nmol NADPH/min/mg protein, respectively. ^b P<0,05 when compared sedentary/6-OHDA with sedentary/vehicle. ^c P<0,05 when compared exercise/vehicle with sedentary/vehicle. ^d P<0,05 when compared exercise/6-OHDA with sedentary/6-OHDA. ^e P<0,05 when compared exercise/6-OHDA with sedentary/vehicle.

PARTE III

DISCUSSÃO

As principais hipóteses dessa dissertação baseiam em recentes estudos, demonstrando que através do exercício físico houve uma melhora nos sintomas motores em pacientes e em modelos animais da DP (Tillerson et al., 2003; Fisher et al., 2004; Petzinger et al., 2007) e, também, nos sintomas neuropsiquiátricos (Babyak et al., 2000; Barbour et al., 2005; De Moor et al., 2006; Duman et al., 2008). O objetivo deste estudo foi investigar o impacto do exercício em um modelo experimental de DP, induzido por 6-OHDA em camundongos, com um nível moderado neurodegeneração e explorar possíveis mecanismos de neuroproteção induzida pelo exercício. Durante 4 semanas após a injeção de 6-OHDA, ou solução salina, os camundongos foram submetidos a treinamento de natação (TN) 5 dias/semana ou permaneceram sedentários. Com este protocolo, demonstrou-se que TN protegeu o estriado de camundongos contra o estresse oxidativo, neuroinflamação e à diminuição dos níveis de DA, DOPAC e HVA causados pela infusão de 6-OHDA. O efeito neuroprotetor do exercício também foi confirmado pela melhora comportamental, assim, o grupo submetido ao exercício demonstrou melhora em relação ao sedentário no prejuízo cognitivo, teste tipo depressivo e atividade locomotora.

O TN é considerado um protocolo de exercício eficaz para aumentar a capacidade oxidativa do músculo e promover a adaptação ao exercício físico em camundongos semelhantes aos observados em humanos (Gobatto et al., 2001; Voltarelli et al., 2002). Da mesma forma, nadar é uma habilidade natural de roedores e o TN não tem a presença de estímulo elétrico como fator de estresse (Contarteze et al., 2008). O TN é mais apropriado para modelos de animais com lesões neurodegenerativas e com depleção DA parcial. Tais modelos animais são adequados para estudos de descoberta de drogas e, conseqüentemente, teste utilizando natação pode servir como uma ferramenta valiosa para avaliar disfunções no comportamento motor em estudos neuroprotetores (Haobam et al., 2005).

A depressão está entre as condições psiquiátricas mais comuns que acompanham DP. De fato, de acordo com os critérios utilizados, a depressão pode afetar 10-45% dos pacientes com DP (Noyce et al., 2012). Além disso, demonstrou-se que a depressão pode preceder o início dos sintomas motores da DP (Nilsson et al., 2001; Noyce et al.,

2012). Verificou-se no teste de suspensão pela cauda (TST), um dos testes mais utilizados para avaliar um comportamento semelhante ao da depressão em roedores (Cryan et al., 2005), estão de acordo com os dados clínicos (Pollak et al., 2010). Os resultados indicam que a infusão da neurotoxina 6-OHDA foi capaz de produzir um efeito tipo depressivo avaliado pelo TST. Além disso, a alteração no TST foi encontrado 5 semanas após a lesão, quando não houve alteração da atividade locomotora no teste do campo aberto. Esses resultados sugerem que o aparecimento da depressão como o comportamento antecessor aos sintomas motores. Além disso, as alterações no sistema dopaminérgico sugerem, portanto, que os sistemas de neurotransmissores desempenham um papel importante nos comportamentos semelhantes à depressão nos atuais modelos testados, apoiando ainda mais o envolvimento desses sistemas de neurotransmissores relacionando a depressão na DP (Schrag, 2004; Zhang et al. 2011). Este resultado apoia o nosso ponto de vista que os camundongos injetados com 6-OHDA sofreram um processo depressivo semelhante ao que foi relatado anteriormente por outros grupos (Branchi et al, 2008; Tadaiesky et al, 2008; Santiago et al, 2010). Os resultados demonstram que o grupo de exercício obteve menor tempo de imobilidade do que o grupo 6-OHDA/sedentário, mostrando que o ST possui capacidade tipo antidepressiva - como efeito neste modelo de DP induzida pela 6-OHDA, em camundongos. Esta atividade antidepressiva do TN em um modelo de DP foi correlacionada com as alterações neuroquímicas e neuroinflamatória a nível estriatal. O presente estudo também revelou o potencial neuroprotetor do TN contra 6-OHDA induzindo um modelo dos sintomas da DP em camundongos. Este resultado demonstrou que a injeção de 6-OHDA resultou na alteração comportamental (no teste de rota-rod, com o tempo de primeira queda) foi revertida pelo TN em camundongos.

Além de deficit emocionais apresentadas em pacientes com DP, esta doença parece produzir deficit cognitivos, especialmente em procedimentos de memória. O estriado tem sido a principal área indicada em disfunções de aprendizagem processuais (Saint-Cyr et al, 1988; Tadaiesky et al, 2008), consistente com estudos anteriores que relatam que os modelos DP prejudicam o desempenho de camundongos no teste de reconhecimento de objetos (TRO) (De Leonibus et al., 2007; Magen et al, 2012). Este teste é considerado adequado para estudar o efeito do exercício na cognição e não envolve elementos aversivos fortes, tais como choque no pé empregado durante o condicionamento do medo ou privação de alimentos (Hopkins e Bucci 2010). O TRO explora a tendência natural dos animais para explorar novos estímulos, de preferência a

estímulos conhecidos e é usado para avaliar a memória declarativa. Os nossos dados demonstram que a injeção de 6-OHDA no comprometimento da memória de longo prazo (MLP) em camundongos sedentários, revela uma redução do índice de reconhecimento de novo objeto. É importante ressaltar que o percentual de DA, DOPAC e HVA estriatal, e aumento da neuroinflamação e estresse oxidativo observados neste estudo foi semelhante aos estudos anteriores que mostram déficit em tarefas de memória (Miyoshi et al, 2002;. Ferro et al, 2005;. De Leonibus et al., 2009). Quanto aos deficit cognitivos encontrados neste teste, nossos resultados suportam a hipótese de um envolvimento do corpo estriado, níveis de DA, DOPAC e HVA, deficit antioxidantes e neuroinflamação induzidas por 6-OHDA na memória neste modelo de DP. No nosso estudo, o TN protege contra deficit cognitivo induzido pela 6-OHDA, preservando MLP, evitando a redução do índice de reconhecimento no TRO devido a mecanismos tais como antioxidante, anti-inflamatório e proteção contra a redução nos níveis de DA.

Neste estudo, a infusão de 6-OHDA causou uma produção excessiva de radicais livres que, por sua vez, causou danos oxidativos na membrana lipídica, e em última análise, conduziu uma alteração na atividade de enzimas antioxidantes. O dano oxidativo neuronal em roedores infundidos por 6-OHDA é consistente com relatos anteriores (Ahmad et al, 2012; Shobana et al, 2012). A 6-OHDA é uma neurotoxina de catecolaminas seletivas e pode facilmente ser submetido à auto-oxidação para produzir peróxido de hidrogênio e os radicais superóxido que participam de maneira secundária na reação catalisada por metal de Haber-Weiss produzindo radicais hidroxila livres (Opacka-Juffry et al., 1998). Como resultado, os camundongos sedentários expostos a 6-OHDA teve uma inibição da atividade da GPx e um aumento da atividade de GR e de GST e os níveis de espécies reativas (ER). Por outro lado, nós demonstramos que a atividade de CAT permaneceu inalterada em todos os grupos. Em relação à atividade de CAT, este fato pode ser explicado em parte devido aos níveis mais baixos de CAT naturalmente encontrados no cérebro de camundongos (Aksu et al., 2009). Demonstramos ainda que o TN, foi capaz de reverter a inibição da atividade da GPx e o aumento da atividade de GR e GST e níveis de ER induzido pela 6-OHDA no estriado de camundongos. Dessa maneira, o nosso estudo demonstrou que o exercício protegeu contra este mecanismo neurotóxico da 6-OHDA no estado redox celular no cérebro por modulação de enzimas antioxidantes.

A neuroinflamação é um processo fundamental para a neuropatogênese de DP e envolve a liberação de uma série de moléculas a partir da ativação da microglia, tais como ER neurotóxicas e citocinas (Barnum e Tansey, 2010; Hirsch et al 2012). Os níveis excessivos de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β são capazes de induzir a lesão neuronal por meio de uma variedade de mecanismos da DP, incluindo a geração de EROs (Koprich et al., 2008) e ligando-se diretamente aos seus receptores na célula superfícies dos neurônios dopaminérgicos (Phani et al., 2012). Sob condições fisiológicas tais citocinas são expressas em baixos níveis no cérebro, mas podem ser induzidas por insultos resultantes na neurodegeneração (Zhao et al, 2007; Koprich et al, 2008). Os nossos dados demonstram claramente que a injeção de 6-OHDA induziu um aumento expressivo nos níveis IL-1 β no corpo estriado de camundongos sedentários. Neste estudo, verificou-se que o TN protegeu contra o efeito induzido pela 6-OHDA, reforçando relatos que mostram o efeito anti-inflamatório do exercício neste modelo da DP (Mabandla e Russell, 2010; Tajiri et al, 2010; Dimatelis et al ., 2012).

A medição das monoaminas neurotransmissoras no estriado serve como um importante método para determinar há existência ou não uma droga específica com efeito terapêutico sobre os neurônios dopaminérgicos (Moore et al., 2005). As atividades dos neurônios dopaminérgicos pode, assim, ser inferido através da determinação dos níveis de DA, DOPAC e HVA no cérebro ou no fluido cerebrospinal (Moore et al., 2005). Para este fim, utilizou HPLC-ECD para detectar as monoaminas neurotransmissoras de no corpo estriado de camundongos, e verificar se os níveis de DA, DOPAC e HVA foram significativamente menores após a infusão de 6-OHDA, semelhante a estudos anteriores (Glajch et al., 2012; Heuer et al., 2012;. Shobana et al., 2012). Pode inferir-se que neste estudo, o TN pode inibir a neurotoxicidade induzida nas catecolaminas pela 6-OHDA e manter a concentração de DA e os seus metabólitos na normalidade ou próximo dos níveis do grupo controle. Portanto, o TN parece atuar, neste modelo de DP induzida pela 6-OHDA, através de mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios e atenuando a perda de DA e metabólitos que auxiliam as células comprometidas no estriado de camundongos.

O presente estudo demonstrou que um TN de 4 semanas com baixa intensidade foi eficaz em atenuar as seguintes deficiências resultantes da exposição a 6-OHDA em camundongos: (1) comportamento tipo depressivo no TST, (2) aumento do número de quedas no teste roda-rod, (3) no prejuízo na MLP no TRO, (3) o aumento dos níveis de ER, (4) inibição da atividade da GPx e aumento da atividade de GR e GST, (5) o

aumento dos níveis de IL-1 β e (6) diminuição dos níveis de DA, DOPAC e HVA. Em vista, nossos resultados indicaram que o ST agiu como um agente neuroprotetor ao analisar os parâmetros comportamentais, neuroquímicos e bioquímicos. Os mecanismos envolvidos no presente estudo são a modulação das atividades de GPx, GR e GST e do nível de IL-1 β no modelo de DP induzido pela 6-OHDA em camundongos e, portanto, a proteção contra o declínio dos níveis de DA, DOPAC e HVA no estriado de camundongos. Estes resultados reforçam que os efeitos induzidos pelo exercício em doenças neurodegenerativas, tais como DP, são devido a sua propriedade antioxidante e anti-inflamatória.

Em conclusão, pode-se sugerir que o exercício atenua declínios cognitivos e motores, depressão, estresse oxidativo e neuroinflamação induzidas pela 6-OHDA em camundongos, suportando a hipótese de que o exercício pode ser usado como ferramenta não farmacológica para atenuar os sintomas da DP.

CONCLUSÕES

Com os dados obtidos é possível concluir que o protocolo de natação utilizado foi eficaz em atenuar o dano causado pela injeção de 6-OHDA no estriado de camundongos em um modelo da DP.

Com isso, a natação surge como alternativa de exercício, além dos terrestres já utilizados, a ser utilizada como um possível tratamento auxiliar para a DP.

PERSPECTIVAS

Afim de elucidar melhor o papel da natação como possível meio no auxílio da prevenção e ao tratamento farmacológico da DP, este trabalho terá continuidade no doutorado. Neste sentido, o protocolo utilizado será modificado, desde o modelo (pretende-se utilizar o MPTP ao invés da 6-OHDA) até o protocolo de exercício físico utilizado (sendo que nesse caso, pretende-se averiguar o papel do exercício antes e após o modelo induzido a DP). Além disso, pretende-se medir outros marcadores inflamatórios além da IL-1 β , imuno-histoquímica, quantificar as EROs (por fluorescência) e, averiguar a atividade e expressão de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx).

REFERÊNCIAS

AGUIAR JUNIOR, A.S. O exercício físico como agente modificador da doença de Parkinson e das discenesias induzidas por L-DOPA: evidencia obtida em modelos experimentais/ Aderbal Silva Aguir Junior; orientador, Rui Daniel Schöder Prediger. UFSC, tese doutorado – Florianópolis, SC, 2011.

AGUIAR, A.S.,JR.; BOEMER, G.; RIAL, D.; CORDOVA, F.M.; MANCINI, G.; WALZ, R.; DE BEM, A.F.; LATINI, A.; LEAL, R.B.; PINHO, R.A.; PREDIGER, R.D. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. **Neuroscience**. 2010;171:1216-27.

AGUIAR, A.S.,JR.; PREDIGER, R.D. Brain in Moviment: The Role of Physical Exercise in Parkinson's Disease. In: LIBERMAN, D.C. (Ed.). *Aerobic Exercise and Athletic Performance: Types, Duration and Health Benefits*. New York: **Nova Science Publisher**. 2010:85-120.

AGUIAR, A.S.,JR.; TUON, T.; PINHO, C.A.; SILVA, L.A.; ANDREAZZA, A.C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; STRECK, E.L.; PINHO, R.A. Intense exercise induces mitochondrial dysfunction in mice brain. **Neurochem Res**. 2008;33:51-8.

AHMAD, S.; KHAN, M.B.; HODA, M.N.; BHATIA, K., HAQUE, R.; FAZILI, I.S.; JAMAL, A.; KHAN, J.S.; KATARE, D.P. Neuroprotective effect of sesame seed oil in 6-hydroxydopamine induced neurotoxicity in mice model: cellular, biochemical and neurochemical evidence. **Neurochem Res**. 2012;37:516-26.

AKSU, I.; TOPCU, A.; CAMSARI, U.M.; ACIKGOZ, O. Effect of acute and chronic exercise on oxidant–antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. **Neurosci Lett**. 2009;452:281-85.

ALEXI, T.; BORLONGAN, C.V.; FAULL, R.L.M.; WILLIAMS, C.E.; CLARK, R.G.; GLUCKMAN, P.D.; HUGHES, P.E. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. **Prog Neurobiol**. 2000;60:409-470.

AL-JARRAH, M.; POTHAKOS, K.; NOVIKOVA, L.; SMIRNOVA, I.V.; KURZ, M.J.; STHENO-BITTEL, L.; LAU, Y.S. Endurance exercise promotes cardiorespiratory rehabilitation without neurorestoration in the chronic mouse model of parkinsonism with severe neurodegeneration. **Neuroscience**. 2007;149:28-37.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE (ACSM). *ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription*. Baltimore: Williams & Wilkins, 2000;p.368 - 6th.ed.

ARAKI, T.; MIKAMI, T.; TANJI, H.; MATSUBARA, M.; IMAI, Y.; MIZUGAKI, M.; ITOYAMA, Y.. Biochemical and immunohistological changes in the brain of 1-methyl-

4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP)-treated mouse. **Eur J Pharm Sci.** 2001;12:231-238.

ARIDA, R.M.; CAVALHEIRO, E.A.; SCORZA, F.A. From depressive symptoms to depression in people with epilepsy: Contribution of physical exercise to improve this picture. **Epilepsy Res.** 2012;99:1-13.

ASANUMA, M. et al. Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. **Acta Med Okayama.** 2004;58(5):221-33.

AYÁN, C.; CANCELA, J. Feasibility of 2 different water-based exercise training programs in patients with Parkinson's disease: a pilot study. **Arch Phys Med Rehabil.** 2012;93:1709-14.

BABYAK, M.; BLUMENTHAL, J.A.; HERMAN, S.; KHATRI, P.; DORAISWAMY, M.; MOORE, K. Exercise treatment for major depression: maintenance of therapeutic benefit at 10 months. **Psychosom Med.** 2000;62:633-8.

BARBEAU, A. The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. **Can Med Assoc J.** 1962;87:802-7.

BARBOUR, K.A.; BLUMENTHAL, J.A. Exercise training and depression in older adults. **Neurobiol Aging.** 2005;26:119-23.

BARNUM, C.J.; TANSEY, M.G. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. **Prog Brain Res.** 2010;184:113-32.

BERG, D.; YODIM, M.B.; RIEDERER, P. Redox imbalance. **Cell Tissue Res.** 2004;318:201-13.

BERLIN, J.A.; COLDITZ, G.A. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. **Am J Epidemiol.** 1990;132:612-28.

BLANDINI, F.; NAPPI, G.; TASSORELLI, C.; MARTIGNONI, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.** 2000;62:63-88.

BLESA, J.; PHANI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. **J Biome and Biotech.** 2012:1-10.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A.L.; SADOUL, R.; VERNA, J.M. Molecular pathway involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.** 2001;65:135-72.

BOBINSKI, F.; MARTINS, D.F.; MAZZARDO-MARTINS, L.; WINKELMANN-DUARTE, E.C.; GUGLIELMO, L.G.A.; SANTOS, A.R.S. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience.** 2011;194:337-48.

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

BOWEN, B.D.; CARMER, M.E. The Effect of a Standard Exercise Upon the Oxygen Consumption of Normal, Overweight, and Chronically Ill Individuals. **J Clin Invest**. 1926;2:299-313.

BOYSON, S.J.; PARKER, W.D.,JR.; PARKS, J.K. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. **Ann Neurol**. 1989;26:719-23.

BRANCHI, I.; D'ANDREA, I.; ARMIDA, M.; CASSANO, T.; PÈZZOLA, A.; POTENZA, R.L.; MORGESE, M.G.; POPOLI, P.; ALLEVA, E. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. **J Neurosci Res**. 2008;86:2050-61.

BROCARD, P.S.; BOEHME, F.; PATTEN, A.; COX, A.; GIL-MOHAPEL, J.; CHRISTIE, B.R. Anxiety- and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise. **Neuropharmacology**. 2012;62:1607-18.

BUDGETT, R.; CASTELL, L.; NEWSHOLME, E.A. - The overtraining syndrome. In: HARRIES, M.; WILLIAMS, C.; STANISH, W.D.; MICHELI, L.J., ed -Oxford textbook of sports medicine. 2.ed. New York, 1998. p. 367-377.

CASAS, S.; GARCÍA, S.; CABRERA, R.; NANFARO, F.; ESCUDERO, C.; YUNES, R. Progesterone prevents depression-like behavior in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in male rats. **Pharmacol Biochem Behav**. 2011;99:614-18.

CASSILHAS, R.C.; LEE, K.S.; FERNANDES, J. OLIVEIRA, M.G.M.; TUFIK, S.; MEEUSEN, R. DE MELLO, M.T. Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. **Neuroscience**. 2012;202:309-17.

CHOI, W.S; YOON, S.Y; OH, T.H; CHOI, E.J; O'MALLEY, K.L; OH, Y.J. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine-and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. **J Neurosci Res**.1999;57:86-94.

COLCOMBE, S.J.; ERICKSON, K.I.; RAZ, N. et al. Aerobic fitness reduces brain tissue loss in aging humans. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci**. 2003;58A:176-80.

COLCOMBE, S.J.; ERICKSON, K.I.; SCALF, P.E. et al. Aerobic exercise training increases brain volume in aging humans. **J Gerontology: MEDICAL SCIENCES**. 2006;61A:1166-70.

CONTARTEZE, R.V.L.; MANCHADO, F.D.B.; GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A.R. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. 2008;151:415-22.

- COTZIAS, G.C.; PAPAVALIIOU, P.S.; GELLENE, R. Modification of parkinsonism – chronic treatment with L-dopa. **N Engl J Med.** 1969;280:337-45.
- CROISIER, E. et al. Microglial inflammation in the parkinsonian substantia nigra: relationship to alpha-synuclein deposition. **J Neuroinflammation.** 2005;2(14):1-8.
- CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci Biobehav Rev.** 2005;29:571-625.
- CUMMINGS, J.L. Depression and Parkinson's disease: a review. **Am J Psychiatry.** 1992;149: 443-54.
- DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron.** 2003;39:889-909.
- DE LEONIBUS, E.; MANAGÒ, F.; GIORDANI, F.; PETROSINO, F.; LOPEZ, S.; OLIVERIO, A.; AMALRIC, M.; MELE, A. Metabotropic glutamate receptors 5 blockade reverses spatial memory deficits in a mouse model of Parkinson's disease. **Neuropsychopharmacology.** 2009;34:729-38.
- DE LEONIBUS, E.; PASCUCCI, T.; LOPEZ, S.; OLIVERIO, A.; AMALRIC, M.; MELE, A. Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. **Psychopharmacology.** 2007;194:517-25.
- DE MOOR, M.H.; BEEM, A.L.; STUBBE, J.H.; BOOMSMA, D.I.; DE GEUS, E.J. Regular exercise, anxiety, depression and personality: a population-based study. **Prev Med.** 2006;42:273-9.
- DIMATELIS, J.J.; HENDRICKS, S.; HSIEH, J.H.; VLOK, M.N.; BUGARITH, K.; DANIELS, W.M.; RUSSELL, V.A. Exercise partially reverses the effect of maternal separation on hippocampal proteins in 6-hydroxydopamine lesioned rat brain. **Exp Physiol.** 2012;doi:10.1113/expphysiol.2012.066720.
- DRUMOND, L.E.; MOURÃO, F.A.G.; LEITE, H.R. et al. Differential effects of swimming training on neuronal calcium sensor-1 expression in rat hippocampus/cortex and in object recognition memory tasks. **Brain Res Bull.** 2012;88:385-91.
- DUMAN, C.H.; SCHLESINGER, L.; RUSSELL, D.S.; DUMAN, R.S. Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice. **Brain Res.** 2008;1199:148-58.
- ELBAZ, A.; DUFOUIL, C.; ALPÉROVITCH, A. Interaction between genes and environmental in neurodegenerative disease. **C R Biologies.** 2007;330:318-28.
- EYRE, H.; BAUNE, B.T. Neuroplastic changes in depression: A role for the immune system. **Psychoneuroendocrinology.** 2012;37:1397-416.

FALL, P.A.; FREDRIKSON, M.; AXELSON, O.; GRANERUS, A.K. Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden. **Mov Disord**. 1999;14:28-37.

FEARNLEY, J.M.; LEES, A.J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain**. 1991;114(5):2283-301.

FERRO, M.M.; BELLISSIMO, M.I.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; ANGELLUCCI, M.E.; CANTERAS, N.S.; DA CUNHA, C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **J Neurosci Methods**. 2005;148:78-87.

FISCHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R.J. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. **Dynamic Med**. 2009;8:1.

FISHER, B.E.; PETZINGER, G.M.; NIXON, K.; HOGG, E.; BREMMER, S.; MESHUL, C.K. Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse basal ganglia. **J Neurosci Res**. 2004;77:378-90.

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

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. **Neuro Report** 2002;13:75-82.

GILADI, N; TREVES, T.A; PALEACU, D et al. Risk factors for dementia, depression and psychosis in long-standing Parkinson's disease. **J Neural Transm**. 2000;107(1):59-71.

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

GLEESON, M.; BISHOP, N.C.; STENSEL, D.J.; LINDLEY, M.R.; MASTANA, S.S.; NIMMO, M.A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature**. 2011;11:607-615.

GLINKA, Y; YOUDIM, M.B. Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. **Eur J Pharmacol**. 1995;292:329-32.

GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A.; SIBUYA, C.Y.; DE AZEVEDO, J.R.; DOS SANTOS, L.A.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. 2001;130:21-27.

GOLDMAN, W.P; BATY, J.D; BUCKLES, V.D; SAHRMANN, S; MORRIS, J.C. Cognitive and motor functioning in Parkinson's disease – subjects with and without questionable dementia. **Arch Neurol**. 1998;55:674-80.

GOMEZ-PINILLA, F.; YING, Z.; ROY, R.R.; MOLTENI, R.; EDGERTON, V.R. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **J Neurophysiol.** 2002;88:2187-95.

GOODWIN, V.A.; RICHARDS, S.H.; TAYLOR, R.S.; TAYLOR, A.H.; CAMPBELL, J.L. The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord.** 2008;23:631-40.

GORELL, J.M.; JOHNSON, C.C.; RYBICK, B.A.; PETERSON, E.L.; RICHARDSON, R.J. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. **Neurology.** 1998;50:1346-50.

GUPTA, A.; BHATIA, S. Psychological functioning in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.** 2000;6:185-90.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a causal link? **Exp Neurology.** 2005;193:279-90.

HAOBAM, R.; SINDHU, K.M.; CHANDRA, G.; MOHANAKUMAR, K.P. Swim-test as a function of motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: a comparative study in two mouse strains. **Behav Brain Res.** 2005;8:159-67.

HASKELL, W.L.; LEE, I.M.; PATE, R.R. et al. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sport Medicine and the American Heart Association. **Med Sci Sport Exerc.** 2007;39:1423-34.

HAVEL, R.J.; NAIMARK, A.; BORCHEGREWINK, C.F. Turnover rate and oxidation of free fatty acids of blood plasma in man during exercise: studies during continuous infusion of palmitate-1- C^{14} . **J Clin Invest.** 1963;42:1054-63.

HAYES, K.; SPRAGUE, S.; GUO, M.; DAVIS, W.; FRIEDMAN, A.; KUMAR, A.; JIMENEZ, D.F.; DING Y. Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. **Acta Neuropathol.** 2008;115:289-96.

HEDELIN, R.; KENTTÁ, G.; WIKLUND, U.; BJERLE, P.; HENRIKSSONLARSEN, K. – Short-term overtraining: effects on performance, circulatory responses, and heart rate variability. **Med Sci Sports Exerc.** 2000;32:1480-84.

HEUER, A.; SMITH, G.A.; DUNNETT, S.B. Comparison of 6-hydroxydopamine lesions of the substantia nigra and the medial forebrain bundle on a lateralised choice reaction time task in mice. **Eur J Neurosci.** 2012;doi: 10.1111/ejn.12036.

HIRSCH, E.C.; VYAS, S.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.** 2012;18:210-12.

HIRSCH, M.A.; TOOTLE, T.; MAITLAND, C.G.; RIDER, R.A. The effects of balance training and high-intensity resistance training on persons with idiopathic Parkinson's disease. **Arch Phys Med Rehabil.** 2003;84:1109-17.

HOPKINS, M.E.; BUCCI, D.J. BDNF expression in perirhinal cortex is associated with exercise-Induced improvement in object recognition memory. **Neurobiol Learn Mem.** 2010;94:278-84.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Censo Demográfico, 2000. Rio de Janeiro: IBGE.

ISCHIROPOULOS, H.; BECKMAN, J.S. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? **J Clin Invest.** 2003;111:163-69.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Ann Neurol.** 2003;53:S26-S38.

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

KATZENSCHLAGER, R.; LEES, A.J. Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. **J Neurology.** 2002;249(2):19-24.

KIRIK, D; ROSENBLAD, C; BJORKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6- hydroxydopamine in the rat. **Exp Neurol.** 1998;152:259-77.

KLOCKGETHER, T. Parkinson's disease: clinical aspects. **Cell Tissue Res.** 2004;318:115-20.

KNOWLER, W.C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S.E.; HAMMAN, R.F.; LACHIN, J.M.; WALKER, E.A.; NATHAN, D.M. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med.** 2002;346:393-403.

KOPRICH, J.B.; RESKE-NIELSEN, C.; MITHAL, P.; ISACSON, O. Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. **J Neuroinflammation.** 2008;5:8.

KUIPERS, H. Training and Overtraining: an introduction. **Med Sci Sports Exerc.** 1998;30:1137-1139.

LAU, Y.S.; PATKY, G.; DAS-PANJA, K; LE, W.D.; AHMAD, S.O. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. **Eur J Neurosci.** 2011;33:1264-74.

LEE, J.K.; TRAN, T.; TANSEY, M.G. Neuroinflammation in Parkinson's Disease. **J Neuroimmune Pharmacol.** 2009;4:419-29.

LEE, C.S; SAUER, H; BJÖRKLUND, A. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Neuroscience.** 1996;72:641-53.

- LEE MOSLEY, R.; BENNER, E. J.; KADIU, I.; THOMAS, M.; BOSKA, M.D.; HASAN, K.; LAURIE, C.; GENDELMAN, H.E. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Res.** 2006;6:261-81.
- LEENTJENS, A.F; VAN DEN AKKER, M; METSEMAKERS, J.F; LOUSBERG, R; VERHEY, F.R. Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: a register study. **Mov Disord.** 2003;18(4):414-8.
- LIM, E. A walk through the management of Parkinson's disease. **Annals Acad of Med Singapore.** 2005;34:188-95.
- LIU, H.H.; TSAI, M.C.; CHEN, C.J.; JENG, J.S.; CHANG, Y.C.; CHEN, S.Y.; CHEN, R.C. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. **Neurology.** 1997;48:1583-8.
- LIU, H.; ZHAO, G.; CAI, K.; ZHAO, H.; SHI, L. Treadmill exercise prevents decline in spatial learning and memory in APP/PS1 transgenic mice through improvement of hippocampal long-term potentiation. **Behav Brain Res.** 2011;218:308-14.
- LOMBARDO, T.A.; ROSE, L.; TAESCHLER, M.; TULUY, S.; BING, R.J. The effect of exercise on coronary blood flow, myocardial oxygen consumption and cardiac efficiency in man. **Circulation.** 1953;7:71-8.
- MABANDLA, M.V.; RUSSELL, V.A. Voluntary exercise reduces the neurotoxic effects of 6-hydroxydopamine in maternally separated rats. **Behav Brain Res.** 2010;211:16-22.
- MAGEN, I.; FLEMING, S.M.; ZHU, C.; GARCIA, E.C.; CARDIFF, K.M.; DINH, D.; DE LA ROSA, K.; SANCHEZ, M.; TORRES, E.R.; MASLIAH, E.; JENTSCH, J.D.; CHESSELET, M.F. Cognitive deficits in a mouse model of pre-manifest Parkinson's disease. **Eur J Neurosci.** 2012;35:870-82.
- MARGONIS, K.; FATOUROS, I.G.; JAMURTAS, A.Z. et al. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. **Free Radic Biol Med.** 2007;43:901-10.
- MARICLE, R.A; NUTT, J.G; CARTER, J.H. Mood and anxiety fluctuations in Parkinson's disease associated with levodopa infusion: preliminary findings. **Mov Disord.** 1995;10:329-32.
- MARINUS, J; VISSER, M; MARTÍNEZ-MARTÍN, P; VAN HILTEN, J.J; STIGGELBOUT, A.M. A short psychosocial questionnaire for patients with Parkinson's disease: the SCOPA-PS. **J Clin Epidemiol.** 2002;56:61-67.
- McGEER, P.L.; McGEER, E.G. Inflammation and Neurodegeneration in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.** 2004;10:3-7.

MENESES, M.S.; TEIVE, H.A.G. Histórico. In: Meneses, M. S., Teive, H.A.G. (Ed.). Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**. 1996:4-14.

MENZA, M.A; ROBERTSON-HOFFMAN, D.E; BONAPACE, A.S. Parkinson's disease and anxiety: comorbidity with depression. **Biol Psychiatry**. 1993;34:465-70.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R.N.; DA CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Res Bull**. 2002;58:41-47.

MIZUNO, Y.; OHTA, S.; TANAKA, M. et al. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. **Biochem Biophys Res Commun**. 1989;163:1450-5.

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

MORI, H. Pathological substrate of dementia in Parkinson's disease – its relation to DLB and DLBD. **Parkinsonism Relat Disord**. 2005;11:41-5.

MORRIS, M.; IANSEK, R.; SMITHSON, F.; HUXHAM, F. Postural instability in Parkinson's disease: a comparison with and without a concurrent task. **Gait and Posture**. 2000;12:205-16.

NILSSON, F.M.; KESSING, L.V.; BOLWIG, T.G. Increased risk of developing Parkinson's disease for patients with major affective disorder: a register study. **Acta Psychiatr Scand**. 2001;104:380-86.

NOYCE, A.J.; BESTWICK, J.P.; SILVEIRA-MORIYAMA, L.; HAWKES, C.H.; GIOVANNONI, G.; LEES, A.J.; SCHRAG, A. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. **Ann Neurol**. 2012;doi:10.1002/ana.23687.

OERTEL, W.H; HOGLINGER, G.U; CARACENI, T; GIROTTI, F; EICHHORN, T; SPOTTKE, A.E; KRIEG, J.C; POEWE, W. Depression in Parkinson's disease. **An Update Adv Neurol**. 2001;86:373-83.

OLANOW, C.W.; JENNER, P.; BEAL, M.F. Cell death and neuroprotection in Parkinson's disease. **Ann Neurol**. 1998;44:S1-S196.

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

OWEN, A.M; SAHAKIAN, B.J; HODGES, J.R; SUMMERS, B.A; POLKEY, C.E; ROBINS, T.W. Dopamine-dependent frontostriatal planning in early Parkinson's disease. **Neuropsychology**. 1995;9:126-40.

PETZINGER, G.M.; WALSH, J.P.; AKOPIAN, G.; HOGG, E.; ABERNATHY, A.; AREVALO, P. 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.

PHANI, S.; LOIKE, J.D.; PRZEDBORSKI, S. Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**. 2012;18:207-09.

PILLON, B.; ERTLE, S.; DEWEER, B. BONNET, A.M.; VIDAILHET, M.; DUBOIS, B. Memory for spatial location in 'de novo' parkinsonian patients. **Neuropsychologia**. 1997;35:221-28.

POLLAK, D.D.; REY, C.E.; MONJE, F.J. Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. **Ann Med**. 2010;42:252-64.

PORTER, C.C; TOTARO, J.A; STONE, C.A. Effect of 6- hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. **J Pharmacol Exp Ther**. 1963;140:308-16.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. Farmacologia [Trad. Raimundo Rodrigues Santos e outros] – 6ªed. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RICHARD, I.H. Anxiety disorders in Parkinson's disease. **Adv Neurol**. 2005;96:42-55.

RICHARD, I.H; FRANK, S; McDERMOTT, M.P; WANG, H; JUSTUS, A.W; LADONNA, K.A; KURLAN, R. The ups and downs Parkinson's disease: a prospective study of mood and anxiety fluctuations. **Cogn Behav Neurol**. 2004;17:201-7.

RINALDI, N.M. Efeito de dica auditiva na marcha livre e adaptativa em pacientes com doença de Parkinson / Natalia Madalena Rinaldi; orientadora, Lilian Teresa Bucken Gobbi. UNESP – Rio Claro, dissertação mestrado – Rio Claro, SP, 2011.

SAINT-CYR, J.A.; TAYLOR, A.E.; LANG, A.E. Procedural learning and neostriatal dysfunction in man. **Brain**. 1988;111:941-59.

SANTAMARIA, J; TOLOSA, E; VALLES, A. Parkinson's disease with depression: a possible subgroup of idiopathic parkinsonism. **Neurology**. 1986;36:1130-3.

SANTIAGO, R.M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M.M.; DOMBROWSKI, P.A.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.A. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2010;34:1104-14.

SAUER, H; OERTEL, WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6- hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. **Neuroscience**. 1994;59:401-15.

SAVICA, R.; ROCCA, W.A.; AHLSSKOG, J.E. When does Parkinson disease start? **Arch Neurol**. 2010;67:798–801.

SCHAPIRA, A.H.V.; COOPER, J.M.; DEXTER, D.; JENNER, P.; CLARK, J.B.; MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J Neurochem**. 1990;54:823-7.

SCHAPIRA, A.H.V.; COOPER, J.M.; DEXTER, D.; JENNER, P.; CLARK, J.B.; MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **The Lancet**. 1989;333:1269.

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

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esp**. 2004;10:308-13.

SCHRAG A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease-an update. **J Neurol**. 2004;251:795-804.

SIBLEY, D.R. New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**. 1999;39:313-41.

SOMANI, S.M.; RAVI, R.; RYBAK, L.P. Effect of Exercise Training on Antioxidant System in Brain Regions of Rat. **Pharmacol Biochem Behav**. 1995;50:635-639.

TADAIESKY, M.T.; DOMBROWSKI, P.A.; FIGUEIREDO, C.P.; CARGNIN-FERREIRA, E.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R.N. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**. 2008;156:830-40.

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

TAJIRI, N.; YASUHARA, T.; SHINGO, T.; KONDO, A.; YUAN, W.; KADOTA, T.; WANG, F.; BABA, T.; TAYRA, J.T.; 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;1310: 200-7.

TAKAHASHI, H.; WAKABAYASHI, K. Controversy: Is Parkinson's disease entity? Yes. **Parkinsonism Relat Disord**. 2005;11:31-7.

THRELFELL, S.; CRAGG, S.J. Dopamine signaling in dorsal versus ventral striatum: the dynamic role of cholinergic interneurons. **Front Syst Neurosci**. 2011;5:11.

TILLERSON, J.L.; CAUDLE, W.M.; REVERON, M.E.; MILLER, G.W. Exercise induce behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models in Parkinson's disease. **Neuroscience**. 2003;119:899-911.

TOLOSA, E.; GAIG, C.; SANTAMARIA, J.; COMPTA Y. Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. **Neurology**. 2009;72:12-20.

TREJO, J.L.; CARRO, E.; NUNEZ, A.; TORRES-ALEMAN, I. Sedentary life impairs self-reparative processes in the brain: the role of serum insulin-like growth factor-I. **Rev Neurosci**. 2002;13:365-74.

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

VALKO, M., LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Bio**. 2007;39:44-84.

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. Evaluation of risk of Parkinson's disease in a cohort of licensed pesticide users. **Neurol Sci**. 2002;23:S119-S20.

VILLAR-CHEDA, B.; SOUZA-RIBEIRO, D.; RODRIGUEZ-PALLARES, J.; RODRIGUEZ-PEREZ, A.I.; GUERRA, M.J.; LABANDEIRA-GARCIA, J.L. Aging and sedentarism decrease vascularization and VEGF levels in the rat substantia nigra. Implications for Parkinson's disease. **J Cereb Blood Flow Metab**. 2009;29:230-4.

VIVAS, J.; ARIAS, P.; CUDEIRO J. Aquatic therapy versus conventional land-based therapy for Parkinson's disease: an open-label pilot study. **Arch Phys Med Rehabil**. 2011;92:1202-10.

VOLTARELLI, F.A.; GOBATTO, C.A.; DE MELLO, M.A. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Braz J Med Biol Res**. 2002;35:1389-94.

WATANABE, Y.; HIMEDA, T.; ARAKI, T. Mechanism of MPTP toxicity and their implications for therapy of Parkinson's disease. **Med Sci Mon**. 2005;11:17-23.

WHITE, R.P.; WESTERBEKE, E.J. Differences in central anticholinergic actions of phenothiazine derivates. **Exp Neurol**. 1961;4:317-29.

WITJAS, T; KAPHAN, E; AZULAY, J.P; BLIN, O; CECCALDI, M; POUGET, J; PONCET, M; CHERIF, A.A. Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease: frequent and disabling. **Neurology**. 2002;13:408-13.

YANAGISAWA, N. Natural history of Parkinson's disease: From dopamine to multiple systems involvement. **Parkinsonism Relat Disord**. 2006;12:40-6.

YOON, M.C.; SHIN, M.S.; KIM, T.S.; KIM, B.K.; KO, I.G.; SUNG, Y.H.; KIM, S.E.; LEE, H.H.; KIM, Y.P.; KIM, C.J. Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Neuroscience Letters**. 2007;423:12-17.

ZHANG, X.; EGELAND, M.; SVENNINGSSON, P. Antidepressant-like properties of sarizotan in experimental Parkinsonism. **Psychopharmacology**. 2011;218:621-34.

ZHAO, C.; LING, Z.; NEWMAN, M.B.; BHATIA, A.; CARVEY, P.M. TNF-alpha knockout and minocycline treatment attenuates blood-brain barrier leakage in MPTP-treated mice. **Neurobiol Dis**. 2007;26:36-46.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413-4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

PROTOCOLO N° 038/2012

DATA: 19/11/12

Título: EFEITO TERAPÊUTICO DO EXERCÍCIO AERÓBIO E DA CRISINA EM UM MODELO INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS

Pesquisador: Cristiano Ricardo Jesse / André Tiago Rossito Goes

Campus: Itaqui

Telefone: 055 3433-1689

E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br / andrerossitogoes@gmail.com

Após a análise detalhada do projeto de pesquisa a relatoria da CEUA-Unipampa emite parecer **FAVORÁVEL** para o cadastro do protocolo e execução do referido projeto.

Att.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luiz E. Henkes'.

Luiz E. Henkes
Professor Adjunto
Coordenador do CEUA/Unipampa