Andreas Betz

Neuroproteção dopaminérgica pela associação de
exercício físico espontâneo e tratamento crônico
com nicotina no modelo da doença de Parkinson em
ratos – indicativos dos mecanismos envolvidos

São Paulo

2011

Andreas Betz

Neuroproteção dopaminérgica pela associação de
exercício físico espontâneo e tratamento crônico
com nicotina no modelo da doença de Parkinson em
ratos – indicativos dos mecanismos envolvidos

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências,
na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Rejane Fior
Chadi

Co-orientador: Prof. Dr. Gerson Chadi

São Paulo

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SERVIÇO DE BIBLIOTECA
DO INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS / USP**

B 565

Betz, Andreas

Neuroproteção dopaminérgica pela associação de exercício físico espontâneo e tratamento crônico com nicotina no modelo da doença de Parkinson em ratos – indicativos dos mecanismos envolvidos. / Andreas Betz. – São Paulo : A. Betz, 2011.

92p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia : Faculdade de Medicina, Departamento de Neurologia Experimental.

1. Parkinsonismo experimental 2. Exercício físico espontâneo 3. Tratamento crônico com nicotina 4. Neuroproteção I. Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia. II. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Neurologia Experimental. III. Título.

LC: QP 361

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr.(a):

Prof(a). Dr(a).:

Prof(a). Dr.(a):

Prof(a). Dr(a).:

Profa. Dra. Débora Rejane Fior Chadi

A minha família, por acreditar nos meus sonhos e darem muito mais do que todo o suporte para que eu pudesse realizá-los.

A minha esposa, Bee, por ser tão carinhosa e amorosa, me ajudando nos momentos mais difíceis, para que eu continuasse indo em frente.

A minha segunda família, que também possui um lugar reservado no meu coração.

Amo vocês!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, Profa. Dra. Débora Rejane Fior Chadi e Prof. Dr. Gerson Chadi por terem me orientado e disponibilizado os laboratórios para que eu pudesse realizar meus experimentos.

A todas as pessoas dos laboratórios do IB e da FMUSP: obrigado pela ajuda e pelos momentos de descontração. Sem vocês, não seria tão prazeroso realizar este trabalho.

A Profa. Dra. Merari (Dr. Porsche), Prof. Dr. Daniel (Cinco Cinco), João (japonês sem noção!) por se mostrarem não só como colegas de trabalho, mas também como amigos os quais posso contar em qualquer situação.

Aos meus familiares, que sempre torceram por mim.

Aos funcionários e colegas do Instituto de Biociências e da Faculdade de Medicina pelo ótimo convívio e bons momentos de descontração e tensão.

Ao CNPq, a Capes e a Pró-Reitoria de Pós-Graduação pelo fundamental apoio financeiro.

A família Gouvêa Betz: Tanque, Jackie O. e Bee... AMO-TE!!!

OBRIGADO!

RESUMO	IX
---------------------	-----------

ABSTRACT	XI
-----------------------	-----------

1. INTRODUÇÃO	1
----------------------------	----------

1.1. DOENÇA DE PARKINSON	2
1.2. MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO	4
1.3. NICOTINA E PARKINSONISMO	6
1.4. EXERCÍCIO FÍSICO E PARKINSONISMO	9
1.5. FATORES NEUOTRÓFICOS	11

2. OBJETIVOS	15
---------------------------	-----------

2.1. GERAIS	16
2.2. ESPECÍFICOS	16
2.2.1. EXPERIMENTO BIOLÓGICO	16
2.2.2. ANÁLISE COMPORTAMENTAL	17

3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
-------------------------------------	-----------

3.1. ANIMAIS	19
3.2. TRATAMENTO CRÔNICO COM NICOTINA	19
3.3. TREINAMENTO FÍSICO DOS ANIMAIS	20
3.4. ANÁLISE COMPORTAMENTAL	21
3.5. LESÃO ESTRIATAL DOPAMINÉRGICA	22
3.6. EUTANÁSIA E RETIRADA DOS ENCÉFALOS	24
3.7. QUANTIFICAÇÃO DE NICOTINA E COTININA POR HPLC	25
3.8. EXTRAÇÃO DE RNA	28
3.9. PCR EM TEMPO REAL	30
3.10. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOTTING	32
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34

4. RESULTADOS	35
----------------------------	-----------

4.1. TREINAMENTO FÍSICO DOS ANIMAIS	36
4.2. CONCENTRAÇÃO DE NICOTINA E COTININA PLASMÁTICAS	37
4.3. LESÃO ESTRIATAL DOPAMINÉRGICA	38
4.4. ANÁLISE COMPORTAMENTAL	39
4.5. INFLAMAÇÃO E FATORES NEUOTRÓFICOS	41
4.6. NEUROPROTEÇÃO DOS TERMINAIS DOPAMINÉRGICOS	43

5. DISCUSSÃO	46
---------------------------	-----------

5.1. LESÃO ESTRIATAL DOPAMINÉRGICA	47
5.2. ANÁLISE COMPORTAMENTAL	49

5.3. TRATAMENTO CRÔNICO COM NICOTINA.....	50
5.4. ATIVIDADE FÍSICA ESPONTÂNEA.....	53
5.5. INFLAMAÇÃO E FATORES NEUOTRÓFICOS	55
5.6. NEUROPROTEÇÃO DOS TERMINAIS DOPAMINÉRGICOS	56
6. CONCLUSÃO	59

BIBLIOGRAFIA

RESUMO

A doença de Parkinson é uma patologia neurodegenerativa progressiva, que acomete mais de 1% da população acima de 60 anos, caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos do sistema nigroestriatal. O tratamento atualmente disponível não fornece a cura para a doença de Parkinson. Contudo, a abordagem interdisciplinar tem sido capaz de melhorar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Dados descrevem a relação entre o hábito de fumar e menor predisposição a esta doença, sugerindo que a nicotina proteja neurônios dopaminérgicos. Na área experimental, a prática de exercícios físicos também exerce efeitos benéficos nos modelos de parkinsonismo. Juntas, estas observações poderiam propor que a nicotina e o exercício físico atuariam sinergisticamente, de maneira a preservar os neurônios dopaminérgicos. Cinco grupos de ratos Wistar foram submetidos ao implante de pastilhas de nicotina ou placebo e dois destes grupos foram colocados em gaiolas-moradia com acesso às rodas de correr, durante duas semanas. Os outros grupos permaneceram em gaiolas-moradia simples. Foi realizada lesão estriatal unilateral com 6-OHDA em quatro grupos, após a qual os ratos permaneceram em suas respectivas gaiolas, por outras 5 semanas. Os animais foram submetidos por três vezes a testes comportamentais, ao longo das 7 semanas. Por fim, as áreas de interesse foram removidas e processadas para as técnicas de Western Blotting e PCR em tempo real. Os ratos submetidos à atividade física espontânea, com ou sem nicotina, não mostraram déficit na pata contralateral à lesão, contrastando com os ratos sedentários. A interação nicotina - atividade física mostrou-se importante para que a síntese de TH e de NF-200 não diminuísse, além de aumentar os níveis de RNAm do BDNF no corpo estriado e mesencéfalo ventral ipsilaterais à lesão. Estes resultados sugerem que a nicotina sistêmica, associada à atividade física, podem induzir alterações nos núcleos da base, que facilitarão a neuroproteção dos terminais dopaminérgicos estriatais.

ABSTRACT

Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative pathology that affects 1% of the elderly population characterized by death of dopaminergic neurons at the nigrostriatal system. Nowadays the cure is not possible with the treatments available, but an interdisciplinary approach improves the quality of life. It has been already described a relationship between smoking habit and less predisposition for this pathology, suggesting that nicotine could be able to protect dopamine neurons. Besides, it is known that physical activity offers benefic effects in Parkinson's disease models. Together, these observations suggest that nicotine and exercise can act synergistically for dopaminergic neurons protection. Five groups of Wistar rats underwent an operation to implant a nicotine or placebo pellet; two rats were placed in cages with running wheels for 2 weeks after surgery. Remaining groups were maintained in simple cages. Four groups received striatal injection with 6-OHDA, and were returned to their respective cages for additional 5 weeks. Rats were submitted 3 times to behavioral tests along these 7 weeks. At the end of this period, brain areas of interest were removed and submitted to immunoblotting and real-time RT-PCR. Rats exposed to running wheels (placebo and nicotine groups) did not show deficit in the contralateral paw, contrasting to the findings of parkinsonism without physical activity. Nicotine and exercise counteracted the striatal down-regulation of TH synthesis and NF-200 levels. Combined strategies also increased BDNF mRNA levels in the ipsilateral striatum and ventral mesencephalon. Systemic nicotine associated to physical exercise may trigger trophic events in basal ganglia that could lead to neuroprotection within striatal dopaminergic terminals.

1-INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Parkinson

Sabe-se que a doença de Parkinson, o distúrbio mais comum dos núcleos da base, é uma patologia neurológica progressiva que acomete mais de 1% da população mundial acima dos 60 anos, caracterizada por sintomas de bradicinesia, dificuldade para iniciar movimentos, tremor em repouso, rigidez muscular, marcha de pés arrastados e instabilidade postural, podendo apresentar também leve demência.

A doença de Parkinson é causada principalmente pela morte de neurônios dopaminérgicos localizados no núcleo encefálico do mesencéfalo conhecido como substância negra. Este núcleo envia projeções dopaminérgicas para o corpo estriado, uma das áreas que compõem os núcleos da base, no qual a liberação de dopamina é importante para a coordenação dos movimentos.

O corpo estriado está envolvido no controle de movimentos sequenciais, na regulação do tônus e da força musculares. Também atua inibindo o tálamo motor e o núcleo pedúnculo pontino. A inibição excessiva destes núcleos acarreta em distúrbios hipocinéticos, como a doença de Parkinson (LUNDY-EKMAN, 2004).

Na doença de Parkinson, os sintomas começam a aparecer quando cerca de 60% dos neurônios dopaminérgicos da substância negra já estão mortos e há diminuição de cerca de 80% dos terminais dopaminérgicos que chegam ao corpo estriado. Quando o diagnóstico da doença é feito, já existe grande destruição da via dopaminérgica.

Até certo limite, os neurônios dopaminérgicos da substância negra conseguem compensar a perda dos neurônios vizinhos aumentando a liberação de dopamina no corpo estriado. Porém, quando esta compensação não é mais eficiente, os sintomas começam a surgir. Contudo, outros grupamentos catecolaminérgicos, como a área tegmentar ventral e o núcleo rubro, não são significativamente afetados (FRANÇOIS *et al.*, 2000).

Sugere-se que fatores múltiplos, associados aos genéticos, podem levar ao desenvolvimento da doença de Parkinson (SULZER, 2007). No entanto, o motivo que desencadeia a morte dos neurônios dopaminérgicos ainda permanece obscuro.

A perda de dopamina na via direta do corpo estriado reduz o efeito da atividade das áreas motoras do córtex cerebral, diminuindo os movimentos voluntários. A farmacoterapia mais utilizada no tratamento desta patologia é a administração de L-dopa, que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, transformando-se em dopamina. Apesar de a L-dopa ser inicialmente eficaz na redução dos sinais e sintomas da doença, a tolerância a esta droga, seus efeitos colaterais (alucinações, discinesia, delírios, entre outros) e a progressão da doença limitam a eficácia terapêutica em longo prazo (LUNDY-EKMAN, 2004).

Outras terapias possíveis, quando a terapia clínica falha, inclui a destruição/estimulação de grupamentos celulares do tálamo e/ou globo pálido através de cirurgia estereotáxica. Recentemente foi

proposto o implante de células-tronco nas regiões afetadas pela doença, para possível restabelecimento da comunicação neural, ainda em fase de estudo pré-clínico.

Existem diferentes estudos, tanto clínicos quanto experimentais, que buscam melhorar a qualidade de vida dos doentes de Parkinson, através de métodos menos agressivos e com menores efeitos colaterais que os atuais.

1.2. Modelo animal de parkinsonismo

Modelos experimentais da doença de Parkinson são necessários para se obter maiores informações sobre seus mecanismos patológicos. Em estudos com ratos, o método mais utilizado é a injeção de neurotoxina catecolaminérgica diretamente nos núcleos responsáveis pelo parkinsonismo. Esta neurotoxina, a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), atua nas células catecolaminérgicas inibindo enzimas respiratórias mitocondriais (GLINKA *et al.*, 1997), mecanismo que induz a produção de peróxido de hidrogênio (SMITH e ZIGMOND, 2003) e leva os neurônios à morte. Consequentemente, os terminais sinápticos destes neurônios desaparecerão, iniciando o desenvolvimento da doença de Parkinson.

A injeção de 6-OHDA em áreas específicas do cérebro de ratos é a forma amplamente usada para o estudo de parkinsonismo. Esta droga pode ser injetada tanto na substância negra, no feixe medial do prosencéfalo, quanto no corpo estriado. A injeção intraestriatal

leva a uma rápida destruição dos terminais dopaminérgicos deste núcleo, seguida por degeneração progressiva dos corpos celulares dopaminérgicos da substância negra, começando aproximadamente uma semana após a injeção e estendendo-se por várias semanas (SAUER e OERTEL, 1994). Essa degeneração progressiva causada nos ratos é considerada semelhante à doença de Parkinson idiopática em humanos.

As injeções de 6-OHDA no corpo estriado são realizadas na porção dorsal dos núcleos caudado e putâmen. Costuma-se dividir, didaticamente, o corpo estriado dorsal em partes dorsal, ventral, medial e lateral (DEUMENS *et al.*, 2002). A região ventrolateral do corpo estriado, que recebe conexões de regiões motoras e sensoriomotoras do neocórtex, além de inervação dopaminérgica exclusiva da substância negra (KIRIK *et al.*, 1998), seria o equivalente ao putâmen em primatas e humanos. Já a região dorsomedial, além de obter inervações tanto da substância negra quanto da área tegmentar ventral, recebe conexões do córtex frontal e do sistema límbico, fazendo desta região o equivalente ao núcleo caudado em humanos (DEUMENS *et al.*, 2002).

Sendo o putâmen a sub-região estriatal que apresenta a maior depleção de dopamina em pacientes com doença de Parkinson (NYBERG *et al.*, 1983), a lesão com 6-OHDA nas regiões dorsomedial e ventrolateral seriam as de maior interesse porque promoveria nos ratos déficits progressivos de locomoção, iniciação de movimentos,

orientação sensoriomotora e de comportamento em habilidades motoras (DEUMENS *et al.*, 2002), o que faria destes animais um modelo mais fidedigno da doença de Parkinson.

1.3. Nicotina e parkinsonismo

Sabe-se que a nicotina possui relação inversa com a doença de Parkinson. Levando-se em conta o fato de ser a principal substância encontrada nos cigarros de tabaco e sua capacidade de atravessar facilmente a barreira hematoencefálica, muitas pesquisas são feitas tentando desvendar quais mecanismos fazem deste álcali um fator de proteção contra a patologia.

Já é conhecido que a nicotina influencia a atividade, a comunicação sináptica e o comportamento neuronal, além de alterar a morfologia destas células. Conhece-se também sua relação com a expressão gênica de quase todos os sistemas já examinados, incluindo os sistemas colinérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e adrenérgico (SLOTKIN, 2002) através de sua ação em receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) tanto no sistema nervoso central quanto periférico.

Os nAChRs são proteínas de membrana, pentaméricas e variáveis, compostas por subunidades alfa ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) e beta ($\beta 2$ - $\beta 4$), as quais permitem a passagem de íons por poros, resultando em despolarização e aumento da excitabilidade neuronal (McGEHEE e ROLE, 1995).

Diferentes pesquisas propõem que a nicotina tem relação inversa e direta com o parkinsonismo. Primeiramente, conclui-se que a distribuição do sistema colinérgico nicotínico no corpo estriado corresponde ao sistema dopaminérgico (ZHOU *et al.*, 2002). Posteriormente, mostra-se que a nicotina aumenta a liberação de dopamina no corpo estriado, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DANI e BERTRAND, 2007). Por fim, demonstra-se que a nicotina possui ação protetora contra efeitos degenerativos causados por insultos tóxicos (O'NEILL *et al.*, 2002; QUIK, 2004; MUDO *et al.*, 2007; MEISSNER *et al.*, 2004; ZANARDI *et al.*, 2002).

Os efeitos supracitados da nicotina podem alterar a excitabilidade neuronal e/ou resultar em ativação de fatores tróficos que aumentem a integridade nigroestriatal (MUDO *et al.*, 2007), como o fator de crescimento do fibroblasto (FGF-2) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), ambos no corpo estriado (MAGGIO *et al.*, 1998).

Após a lesão com 6-OHDA, quando injetada na substância negra, os nAChRs pós-sinápticos tendem a diminuir, devido à morte de corpos celulares dopaminérgicos nesta região. Analogamente, a quantidade de nAChRs pré-sinápticos no corpo estriado tende a diminuir em consequência da degeneração dos terminais axônicos dopaminérgicos. Porém, BORDIA e colaboradores (2006) mostram que a administração de nicotina em longo prazo previne/restaura o declínio dos nAChRs após o dano nigroestriatal, sugerindo que o

tratamento crônico com nicotina mantém a integridade e a função dos terminais nervosos dopaminérgicos nos ratos lesados.

É consenso que os nAChRs alfa4 e alfa6, no corpo estriado, possuem papel crítico na liberação de dopamina (QUIK e MCINTOSH, 2006). QUIK e colaboradores (2007) sugerem que a nicotina e/ou drogas que atuem nos subtipos alfa4 e/ou alfa6 de nAChRs - pré-sinápticos (QUIK e MCINTOSH, 2006) - possam ser importantes no tratamento da doença de Parkinson. O subtipo alfa6, embora componha apenas 15 a 20% do total de nAChRs no corpo estriado do rato (QUIK, 2004), parece ser particularmente relevante neste contexto por possuir localização mais restrita aos núcleos basais, além de apresentar vulnerabilidade seletiva ao dano nigroestriatal (QUIK *et al.*, 2001).

O subtipo alfa4beta2 é conhecido por auxiliar a regulação da liberação dopaminérgica no corpo estriado (CHAMPTIAUX *et al.*, 2003; SALMINEN *et al.*, 2004) e a indução do RNA_m do FGF-2 na substância negra (BELLUARDO *et al.*, 2000). Contudo, não é exclusivamente responsável pelas mesmas.

A nicotina não se mostra preventiva à perda de neurônios dopaminérgicos nigrais, mas atua seletivamente nos terminais nervosos dopaminérgicos do corpo estriado, parecendo ter maior efetividade na região mais vulnerável à toxicidade. Todavia, postulou-se que a nicotina pode combater a progressão da doença de

Parkinson, particularmente se for utilizada nos estágios iniciais da mesma (QUIK *et al.*, 2006).

1.4. Exercício físico e parkinsonismo

Há muito se sabe que a prática regular de atividades físicas resulta em diversas adaptações orgânicas, decorrentes de alterações metabólicas, endócrinas e neuro-humorais, capazes de melhorar a saúde física e mental do indivíduo (FERREIRA *et al.*, 2001).

Exercícios físicos espontâneos, os quais não demandam estresse significativo, podem melhorar e proteger funções cerebrais por induzirem a expressão de genes, no encéfalo, que levam à síntese de neurotransmissores e/ou de fatores neurotróficos, importantes para a sobrevivência e homeostase neuronal (COTMAN e ENGESSER-CESAR, 2002). A capacidade que a atividade física regular tem de induzir a neuroplasticidade é um dos mais importantes achados obtidos recentemente. Os efeitos benéficos do exercício na saúde e funcionamento cerebral já foram demonstrados em idosos, através da comprovação de melhora em funções cognitivas, bem como na redução da probabilidade de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (FRIEDLAND *et al.*, 2001).

O exercício voluntário pode potencializar o recrutamento de mecanismos compensatórios podendo ter um papel terapêutico

funcional importante na área funcional da doença de Parkinson (O'DELL *et al.*, 2007).

Estudos evidenciam que o aumento da exigência metabólica e atividade neuronal no exercício resultam em adaptação de diversas vias neurais, destacando como principais resultados uma menor taxa basal de catecolaminas; a normalização dos níveis de noradrenalina e dopamina nas áreas de atenção, memória e controle motor; aumento dos níveis de serotonina nas áreas de humor e sua diminuição nas áreas do controle motor, além de aumento na síntese e liberação de endorfinas (DISHMAN, 1997; MCARDLE *et al.*, 1998; MEEUSEN e DE MEIRLEIR, 1995).

Estudos clínicos de pacientes com Parkinson submetidos a exercícios físicos mostraram melhora nas habilidades motoras, função cognitiva, humor e desempenho em atividades de vida diária (PALMER *et al.*, 1986; BAATILE *et al.*, 2000; MIYAI *et al.*, 2000; NIEUWBOER *et al.*, 2001). CRIZZLE e NEWHOUSE (2006), em sua revisão, sugerem que o exercício físico é benéfico para os pacientes com doença de Parkinson, e demonstram resultados significativos na melhora da velocidade de caminhada, flexibilidade espinal, mobilidade geral, habilidade motora, força muscular e redução do número de quedas da própria altura.

Os fatores neurotróficos, devido às suas características, poderiam ser os grandes responsáveis pelos efeitos benéficos do exercício (COTMAN e BERCHTOLD, 2002), por sua ação direta na

fisiologia neuronal, uma vez que é sabido que neurônios de roedores submetidos a exercícios físicos espontâneos em rodas de correr mostram um aumento geral em seus prolongamentos (MOLTENI *et al.*, 2004), e também através da modulação de sistemas de neurotransmissão.

Neste contexto, a utilização de rodas de corrida espontânea, um procedimento sem estresse para o animal, como ferramenta para a regulação da neurotransmissão e produção de fatores neurotróficos em ratos lesados pela 6-OHDA, poderia ser um método não farmacológico eficaz na recuperação destes.

1.5. Fatores neurotróficos

A corrida voluntária em animais é bem conhecida por induzir a produção de fatores neurotróficos como o BDNF e o FGF-2 no sistema nervoso central (NEEPER *et al.*, 1995; GOMEZ-PINILLA *et al.*, 1997; COTMAN e BERCHTOLD, 2002; COTMAN e ENGESSER-CESAR, 2002). Tanto o BDNF quanto o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) podem interferir nas formas necrótica e apoptótica de morte celular (SUN *et al.*, 2005).

O BDNF promove a diferenciação, extensão de prolongamentos e sobrevivência de várias populações de neurônios em cultura, incluindo neurônios estriatais (COTMAN e BERCHTOLD, 2002). Parece também exercer efeito modulatório nos neurônios dopaminérgicos

nigroestriatais remanescentes pelo aumento da liberação de dopamina no estriado (SUN *et al.*, 2005).

VAN HOOMISSEN e colaboradores (2003) demonstram um aumento na expressão do RNA_m do BDNF no hipocampo e na área tegmentar ventral após exercício físico, o que poderia indicar melhora da função dopaminérgica mesolímbica. O BDNF possui alguns efeitos sobre as células dopaminérgicas, dentre eles destacam-se a influência na liberação de dopamina (GOGGI *et al.*, 2002), a alteração da atividade eletrofisiológica (SHEN *et al.*, 1994) e alteração da função dos receptores de dopamina em seus terminais (GUILLIN *et al.*, 2001).

O GDNF é um fator neurotrófico que parece estar relacionado ao parkinsonismo. O fator é um potente agente de sobrevivência para os neurônios dopaminérgicos, sendo retrogradamente transportado para os corpos celulares da substância negra após sua injeção no corpo estriado (ROSEMBLAD *et al.*, 1999). LOPES-MARTIN e colaboradores (1999) mostram que, na presença deste fator, os neurônios dopaminérgicos, quando enxertados no corpo estriado, aumentam em tamanho e formam uma densa rede de comunicação de dendritos e axônios, quando comparados com neurônios dopaminérgicos em sua ausência. Em macacos induzidos ao parkinsonismo, o tratamento com GDNF mostrou melhora na bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (GRONDIN e GASH, 1998).

LIN e colaboradores (1993, 1994) sugerem que o GDNF promova a sobrevivência e diferenciação morfológica, em culturas de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, levando a um aumento no número de células dopaminérgicas, na captação de dopamina, no tamanho da célula e comprimento dos prolongamentos celulares. Os efeitos do tratamento com GDNF também foram efetivamente observados na ramificação de axônios próximos ao sítio de injeção no corpo estriado, mais proeminentemente no globo pálido (ROSEMBLAD *et al.*, 2000).

TRUPP e colaboradores (1996) descrevem aumento nos níveis de RNA_m do receptor Ret em neurônios dopaminérgicos da substância negra, na qual o GDNF exógeno protegia neurônios Ret-positivos contra a morte induzida por 6-OHDA. É aceito que o Ret seja o receptor funcional para o GDNF, e que ambos possuam efeitos no sistema nervoso, tanto periférico quanto central, particularmente em neurônios motores e dopaminérgicos, da substância negra e área tegmentar ventral (SIEGEL e CHAUHAN, 2000).

A administração de nicotina induz a expressão de FGF-2 em áreas encefálicas que contêm nAChRs (BELLUARDO *et al.*, 1998). Este efeito pode estar envolvido com as possíveis ações neuroprotetoras da nicotina (SIEGEL e CHAUHAN, 2000).

Em condições normais, o FGF-2 promove a arborização neuronal, cuja presença já foi evidenciada em neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, bem como em culturas de neurônios

e glias (EMOTO *et al.*, 1989). Foi demonstrado, através das técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ*, que tanto o FGF-2 como seus receptores FGFR1-3 são encontrados em células da substância negra (CLAUS *et al.*, 2004). WALKER e colaboradores (1998) mostram que a imunorreatividade do receptor FGFR1 na substância negra não é alterada em doentes com Parkinson além de haver um aumento na expressão dos receptores FGFR1 e 3, respectivamente, em astrócitos e microglias reativos no cérebro danificado (BALLABRIGA *et al.*, 1997; ENDOH *et al.*, 1994). A utilização, ou o aumento da produção do FGF-2 podem ser mecanismos capazes de salvar neurônios dopaminérgicos, e são atualmente considerados como promessa terapêutica para o tratamento da doença de Parkinson (CLAUS *et al.*, 2004).

Tendo em vista essas afirmações, analisamos a atuação conjunta da administração crônica de nicotina e da atividade física espontânea em ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo experimental, utilizando a neurotoxina 6-OHDA no corpo estriado destes animais.

2-Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos do tratamento crônico com nicotina e da atividade física espontânea em ratos com parkinsonismo experimental.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Experimento biológico

- Estudar o perfil da degeneração/neuroproteção através da quantidade de proteína e RNA_m da tirosina hidroxilase, no corpo estriado e no mesencéfalo ventral dos ratos através das técnicas de Western Blotting e PCR em tempo real;
- Observar a resposta trófica através da expressão do RNA_m do fator neurotrófico derivado de células gliais, do fator neurotrófico derivado do cérebro e do fator de crescimento do fibroblasto no corpo estriado e no mesencéfalo ventral dos ratos através da técnica de PCR em tempo real;
- Avaliar a integridade dos terminais axonais através da quantidade de proteína do neurofilamento-200 no corpo estriado dos ratos através da técnica de Western Blotting;
- Analisar a possível neoformação sináptica através da quantidade de proteína sinaptofisina no corpo estriado dos ratos através da técnica de Western Blotting;
- Quantificar a angiogênese através da proteína laminina no corpo estriado dos ratos através da técnica de Western Blotting;

- Identificar o grau de inflamação do tecido através da quantidade de proteína da nitrotirosina no corpo estriado dos ratos através da técnica de Western Blotting;
- Mensurar a concentração de células gliais através da quantidade de proteína do GFAP e OX-42 no corpo estriado dos ratos através da técnica de Western Blotting;

2.2.2. Análise comportamental

- Verificar a existência e graduar a acinesia de patas dianteiras nos ratos, induzida pela injeção de 6-OHDA no corpo estriado destes, utilizando o teste “adjusting step”.

3-MATERIAL &

MÉTODO

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com idade inicial de 8 semanas, pesando aproximadamente 220-250g. Os ratos foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 07:00 as 19:00 horas) durante todo o experimento e tratados com água e ração *ad libitum*.

Cinco grupos foram separados ao acaso: grupos com lesão estriatal de 6-OHDA → nicotina-treinado (n=8); nicotina sedentário (n=11); placebo-treinado (n=8); placebo-sedentário (n=10) e grupo sham, com lesão estriatal de salina (n=8). Alguns animais dos grupos nicotina-treinado e placebo-treinado permaneceram em ciclo invertido de claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 19:00 as 07:00 horas) (n=4).

3.2. Tratamento crônico com nicotina

Os ratos foram submetidos ao tratamento crônico (50 dias) com nicotina ou placebo na forma de pastilhas de 100mg (Innovative Research of América, Toledo, Ohio), implantadas subcutaneamente, na região lateral do pescoço. O implante das pastilhas foi feito através de pequena cirurgia, na qual os ratos foram anestesiados com uma associação de cetamina/xilazina (62,5mg/kg – 10 mg/kg) por administração intraperitoneal e, sob o efeito desta, foi feita uma incisão na região lateral do pescoço, onde a pastilha foi plantada. O

corte foi suturado com três pontos utilizando agulha e linha cirúrgicas. Os ratos também receberam uma dose de ceftriaxona sódica (40mg/kg/dia) intramuscular, para evitar possível ação infecciosa.

A dose de nicotina foi estabelecida com base nos trabalhos de BUI e colaboradores (1994), de 8mg/kg/dia durante 7 semanas.

3.3. Treinamento físico dos animais

Os animais foram treinados no sistema de rodas de corrida espontânea (Columbus, Oxymax Equal Flow System, EUA). A atividade física espontânea em rodas de correr foi escolhida por ser um procedimento sem estresse para o rato. Além disso, já se estabeleceu uma correlação positiva entre a distância percorrida pelo rato e a síntese de fatores neurotróficos em algumas áreas cerebrais (COTMAN E BERCHTOLD, 2002).

Vinte e quatro horas após o implante das pastilhas de nicotina, os ratos dos grupos treinados foram colocados em caixas acrílicas, onde tiveram livre acesso à roda de correr na fase escura do ciclo, por um período de 11 horas e 30 minutos, durante 2 semanas, até a cirurgia estereotáxica. Durante a fase clara, estes permaneceram acomodados em gaiolas-moradia desprovidas de rodas de correr. Os ratos dos grupos sedentários e do grupo Sham permaneceram em gaiolas-moradia desprovidas de rodas de correr durante todo o período de treinamento dos outros grupos.

Após a cirurgia estereotáxica, os ratos foram submetidos ao treinamento físico espontâneo por outras cinco semanas. Devido à grande quantidade de animais utilizados, o treinamento não foi feito concomitantemente nos diferentes grupos, somando 14 semanas totais de treinamento. Este período de duas mais cinco semanas foi estabelecido com base no trabalho de O'DELL e colaboradores (2007).

O equipamento forneceu a distância percorrida por cada rato durante o período de treinamento físico espontâneo, nas horas de exposição à roda. Esses dados foram armazenados automaticamente por programa específico de computador e depois analisados.

3.4. Análise comportamental

Para verificar a acinesia das patas dianteiras dos ratos, induzida pela injeção de 6-OHDA no corpo estriado, foi utilizado o teste "adjusting step", conforme descrito no trabalho de OLSSON e colaboradores (1995). Cada rato foi gentilmente segurado pelo experimentador com uma mão, de modo que suas patas traseiras ficassem presas. Em seguida, o rato foi colocado em cima de uma tábua de madeira de 90 centímetros de comprimento, com o corpo ligeiramente inclinado para baixo, permitindo que as patas dianteiras permanecessem encostadas na madeira. Com a outra mão, o experimentador segurou a pata dianteira que não foi monitorada,

deixando que apenas uma das patas dianteiras tocasse na superfície da rampa de madeira.

O rato foi, então, colocado em um dos lados da tábua de madeira e movido, vagarosamente, para os lados pelo experimentador, primeiro para o lado direito e depois para o lado esquerdo. O número de toques no chão foi contado para ambas as patas em ambos os sentidos do movimento. Primeiro o teste é feito com a pata direita e, depois, com a pata esquerda.

Foram feitos 3 testes. Cada bateria de teste consistiu em 2 testes por dia (de manhã e de noite) por 3 dias consecutivos, sendo o primeiro antes da lesão estriatal com 6-OHDA; o segundo, 2 semanas após a lesão e o terceiro, 4 semanas após a lesão.

3.5. Lesão estriatal dopaminérgica

Duas semanas após o implante das pastilhas de nicotina, os ratos foram anestesiados utilizando-se novamente associação de cetamina/xilazina (62,5mg/kg – 10 mg/kg) dissolvida em solução salina 0,9%. Após a tricotomia da região dorsolateral da cabeça, os ratos foram posicionados em aparelho estereotático (David Kopf, EUA) com micromanipulador (David Kopf) fixado ao aparelho, o qual possui suporte para a agulha utilizada na injeção da neurotoxina (Fig 1).

Após a pele da cabeça ser rebatida e as suturas cranianas ficarem expostas, foi determinado o bregma. O braço do aparelho

estereotáxico foi posicionado nas coordenadas escolhidas (antero-posterior + 1,2mm, lateral + 3,0mm e dorso-ventral - 4,9mm), determinadas segundo PAXINOS e WATSON (1986) objetivando o corpo estriado dorsomedial/ventrolateral (DEUMENS *et al.*, 2002). Neste ponto, foi feita a perfuração com uma broca dentária, com o cuidado de não ferir a dura-máter. Após a perfuração, a agulha foi deslocada para baixo até atingir o ponto determinado pelas coordenadas e mantida nesta posição para a infusão da neurotoxina.

FIGURA 01: Rato anestesiado, fixado no aparelho estereotáxico.

A 6-OHDA (16 μ g/4 μ l, Sigma, USA), dissolvida em 0,9% de solução salina com ácido ascórbico (0,2mg/ml), foi injetada unilateralmente por 12 minutos no corpo estriado dorsomedial/ventrolateral através de uma seringa Hamilton de 10 μ l acoplada a um sistema de tubos conectados a uma agulha sem

ponta, utilizando-se uma bomba de injeção (Orion, EUA).

Para avaliar o grau de lesão promovido pela injeção da neurotoxina, o grupo de ratos Sham recebeu injeções de salina e ácido ascórbico na mesma concentração, da mesma maneira e na mesma localização do corpo estriado supracitados.

Durante o procedimento cirúrgico, a 6-OHDA preparada e o solvente foram mantidos resfriados em 4°C e protegidos da luz para evitar oxidação. Após os 12 minutos de injeção, a bomba de infusão permaneceu ligada para evitar o refluxo da droga enquanto a agulha era lentamente removida do interior do encéfalo.

A pele dos ratos foi suturada com agulha e linha cirúrgicas e os mesmos foram recolocados em suas gaiolas-moradia. Os ratos receberam doses diárias intramusculares de ceftriaxona sódica (40mg/kg/dia) durante oito dias, e de diclofenaco sódico (3 mg/kg/dia) durante 4 dias após a lesão.

3.6. Eutanásia e retirada dos encéfalos

Para a análise da proteína e do RNA_m das regiões de interesse dos encéfalos, através das técnicas de western blotting e PCR em tempo real, respectivamente, 24 horas após o término do treinamento, os ratos foram decapitados e seus encéfalos removidos rapidamente e dissecados, objetivando remover os núcleos de interesse para a manipulação das técnicas de western blotting e PCR em tempo real. Para a análise topográfica/celular, os animais foram

anestesiados com associação de cetamina/xilazina (62,5mg/kg – 10 mg/kg) dissolvida em solução salina 0,9% e logo em seguida submetidos à perfusão transcardíaca de solução salina (0,9%) e solução fixadora. A solução fixadora foi uma solução modificada de ZAMBONI e DE-MARTINO (1967) e consiste de 4% de paraformaldeído diluído em tampão fosfato (0,1M; pH 7,4). Os encéfalos foram rapidamente removidos e pós-fixados na mesma solução fixadora por 90 min e lavados em solução de sacarose (10%) dissolvida em tampão fosfato por 48hs. Os segmentos da região da substância negra presente no mesencéfalo ventral e a região do corpo estriado foram congelados em isopentano e gelo seco (-35°C) e submetidos ao seccionamento. Cortes seriados de 20µm para a substância negra e para o corpo estriado foram obtidos para análise por imunohistoquímica.

3.7. Quantificação de nicotina e cotinina por HPLC

Para a certificação de que a pastilha de nicotina realmente liberou a dose desejada da droga, foi feita a determinação da concentração plasmática da nicotina e seu principal metabólito, a cotinina. Para isso, amostras de sangue (1mL) foram retiradas através da punção da veia caudal de cada animal, ao fim do experimento, utilizando-se seringas individuais e heparinizadas. Este sangue foi submetido à análise por cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC), adaptado do método desenvolvido por HARIHARAN e colaboradores (1988) e NAKAJIMA e colaboradores (2000).

O princípio básico do HPLC (Shimadzu®) de fase reversa é a retenção, pela coluna de separação, das moléculas hidrofóbicas e seu fracionamento por soluções contendo solventes, como o metanol. Dependendo do grau de hidrofobia, a substância irá se deslocar da coluna mais ou menos facilmente. Se a substância for menos hidrofóbica, irá passar rapidamente, ou seja, seu tempo de retenção é baixo. Por outro lado, se a substância for mais hidrofóbica, sua interação com a coluna será mais forte e será mais difícil sua passagem; com isso, o tempo de retenção será maior. A partir do momento da eluição, as substâncias passam por um detector, neste caso, luz ultravioleta (256nm, Shimadzu®), utilizando-se coluna Supelco Hipersil ODS 5m 25cm x 4,6mm em forno (Shimadzu) a 35°C e fluxo de 1,5ml/min da fase móvel para separação dos componentes a serem analisados, a qual envia um sinal para o computador, formando picos referentes às moléculas que passaram.

As amostras de sangue foram transferidas para microtubos contendo 40 U.I. de heparina sódica (Liquemine, Roche) e submetidas a centrifugação (4500 rpm) durante 15 minutos, em 4°C. O plasma, aproximadamente 500µl, foi separado para um novo tubo e armazenado em -80°C até seu processamento.

Antes da determinação plasmática de nicotina e cotinina, calibrou-se o aparelho com solução padrão, formada por 10ng de

nicotina (Sigma), cotinina (Sigma) e acetanilida (Merck) em fase móvel, constituída de 30mM de citrato (Merck), 30mM de fosfato hidrogenado de sódio (Na_2HPO_4 , Merck), 1mM de ácido heptano 1-sulfônico (Merck), 10% acetonitrila (OmniSolv, Merck), trietilamina (Merck), para ajustar em 5,7 o pH, e filtrada em membrana de 0,2 μm de poro (Millipore). A partir da área dos picos de absorbância gerados pelos padrões, calculou-se a porcentagem de extração destas drogas no plasma de rato não tratado.

Para isso, adicionou-se, em 200 μl de plasma de rato não tratado, nicotina, cotinina, e acetanilida em concentrações conhecidas (10ng de cada, como o procedimento descrito para o padrão), 200 μl de uma solução 5M de NaOH (Merck) e 1M de NaCl (Merck), 700 μl de diclorometano (Merck); após agitar em vórtex durante 1 minuto, os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 12000 rpm por 5 minutos, em 4°C. Adicionaram-se 700 μl de diclorometano a cada tubo, os quais foram novamente agitados em vórtex por mais 1 minuto e então centrifugados, como anteriormente descrito. A fase contendo o diclorometano foi transferida para um novo tubo, colocado em liofilizador (DNA120 SpeedVac, Thermo Savant) durante aproximadamente 25 minutos, até a completa evaporação do solvente orgânico.

As concentrações de nicotina e cotinina, no plasma dos ratos com as pastilhas implantadas, foram determinadas como descrito acima para o cálculo da porcentagem de extração; no entanto, sem a

adição de nicotina ou cotinina (padrão). A área do pico do padrão interno, acetanilida, serviu como parâmetro para o cálculo da porcentagem de extração da nicotina e cotinina do plasma dos ratos, já que a concentração desta droga era conhecida. Cada animal teve a concentração de nicotina e cotinina determinadas em duplicata.

O método foi validado através da construção de curvas de calibração para os três componentes a serem analisados (nicotina, cotinina e acetanilida). Para isso, cinco concentrações destas substâncias foram submetidas a quantificação por HPLC: 2,5; 5; 10; 50 e 100ng. Cada uma das quantificações foi feita em triplicata, e a média aritmética das áreas dos picos foi considerada para a construção das curvas de calibração. Cada curva de calibração foi construída através da plotagem das médias das áreas dos picos referentes a cada concentração de cada droga no eixo das ordenadas, pela respectiva concentração no eixo das abscissas. A correlação linear foi calculada para cada uma das curvas.

3.8. Extração de RNA

Amostras do corpo estriado e do mesencéfalo ventral foram colocadas em microtubos e o RNA total foi extraído utilizando-se Trizol (Invitrogen). As amostras foram homogeneizadas separadamente usando 500 μ L de Trizol gelado. Após uma incubação em temperatura ambiente por 5 minutos, 100 μ L de clorofórmio foram adicionados e os tubos foram manualmente agitados por 15

segundos. Foi feita mais uma incubação em temperatura ambiente por 5 minutos e as amostras foram então centrifugadas em velocidade de 14.000 rpm por 15 minutos, em 4°C. A fase líquida foi transferida para outro microtubo, onde foram adicionados 250µL de isopropanol. As amostras foram então homogeneizadas manualmente e colocadas em freezer -80°C, de um dia para o outro.

Após descongelar, as amostras ficaram em temperatura ambiente por 10 minutos e então centrifugadas em 14.000 rpm por 30 minutos, em 4°C. O sobrenadante foi vertido e 500µL de etanol (75%) foram adicionados em cada amostra e estas foram então submetidas ao vórtex. As amostras foram novamente centrifugadas em 12.500 rpm por 15 minutos, em 4°C, e o sobrenadante foi novamente vertido. Este último passo foi repetido por duas outras vezes. Após a última vertida, as amostras foram secadas em temperatura ambiente por 10 minutos, dissolvidas em 10µL de água DEPC autoclavada, e incubadas por 10 minutos em 60°C. Em seguida, as amostras foram guardadas em freezer -80°C até o uso.

A qualidade do RNA foi verificada com o uso de eletroforese em gel de agarose, e a concentração de RNA foi obtida utilizando-se o aparelho espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000).

3.9. PCR em tempo real

O PCR em tempo real foi utilizado para determinar os níveis relativos de RNAm nas amostras de tecido do corpo estriado e no mesencéfalo ventral.

Após a certificação de que o RNA extraído estava intacto, foi feita a transformação do mesmo em cDNA dupla fita, através de transcrição reversa, a fim de amplificar e tornar a molécula mais estável. Para tanto, a 1µg de RNA total foram adicionados reagentes para a transcrição reversa, assim como a enzima transcriptase reversa, seguindo o protocolo do fabricante (TaqMan – Applied Biosystems, EUA). Resumidamente, em cada amostra foram adicionados tampão TaqMan (1X), $MgCl_2$ (5,5mol/L), nucleotídeos (500µmol/L de cada -ATCG-), hexâmeros randômicos (2,5µmol/L), inibidor de RNase (0,4U/µL) e a enzima transcriptase reversa (1,25U/µL, MultiScribe Reverse Transcriptase), assim como o RNA, utilizando-se microtubo próprio para PCR, atingindo o volume final de 50µL. Além dos tubos experimentais, dois outros tubos controles foram inseridos no ensaio, como controles negativos: um sem a enzima transcriptase reversa e outro sem o RNA. Os tubos foram colocados em um termociclador de acordo com o seguinte protocolo: 10 minutos de incubação em 25°C, seguidos de 30 minutos de transcrição em 48°C e 5 minutos em 95°C para inativação da enzima. Ao final do procedimento, o cDNA foi estocado em freezer -80°C até

sua utilização para quantificação gênica, através de PCR em tempo real.

As sequências específicas de DNA (probes) e os substratos restantes para a transcrição (primers) utilizados continham FAM™ como repórter fluorescente e estão disponíveis comercialmente através da empresa Applied Biosystems. Foram elas: tirosina hidroxilase (Taqman assay: Rn00562500_m1); pró-fator neurotrófico derivado do cérebro-any (capaz de detectar todas as isoformas do fator neurotrófico) (Taqman assay: Avanço - TGGTTATTTTCATACTTCGGTTGCATGA; Reverso - TGTCCGTGGACGTTTGCTT; Repórter CTGCGCCCATGAAAG), fator neurotrófico derivado da glia (Taqman assay: Rn00569510_m1) e fator de crescimento do fibroblasto 2 (Taqman assay: Rn00570809_m1). Foram utilizados primers e probe para RNA ribossômico (18S) como controle da reação; o 18S contém o repórter VIC™ e também é comercialmente disponível (Applied Biosystems, EUA). A tabela 1 exemplifica o protocolo utilizado.

As soluções foram pipetadas em placas de 96 poços com qualidade óptica (ABI Prism, Applied Biosystems, EUA) as quais foram lacradas com adesivo, também com qualidade óptica (ABI Prism, Applied Biosystems, EUA), e submetidas à amplificação e detecção através de PCR em tempo real (modelo 7500, ABI Prism, Foster City, CA, EUA) por 50 ciclos.

Tabela 1: Descrição do protocolo utilizado para o preparo das amostras submetidas à análise por PCR em tempo real.

18S	Volume por reação (25µL)
2x Master Mix	12,5µL
Probe	0,156µL
Primers	0,25µL (reverso e de avanço)
cDNA (diluído 1:100)	5µL
Água DEPC	6,84µL
Demais RNAm	
2x Master Mix	12,5µL
Probe/primers	1,25µL
cDNA	5µL
Água DEPC	6,25µL

Os dados referentes aos RNAm de estudo foram corrigidos através de subtração dos valores referentes ao 18S, e comparados entre si por normalização logarítmica ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001).

3.10. Extração de proteínas e Western blotting

As amostras de tecido do corpo estriado e do mesencéfalo ventral foram homogeneizadas separadamente em PBS, pH 7.4, com 1% NP40, 0.5% de deoxicolato de sódio, 1% de dodecilsulfato de sódio, ácido etilenodiamino tetraacético (1 mM), ácido etileno glicol tetraacético (1 mM), e 1% de coquetel inibidor de protease (Sigma, USA). Após incubação por 30 minutos em gelo e posterior centrifugação em 14.000 rpm por 20 minutos em 4°C, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo e guardado em

freezer -80°C até o uso. A concentração de proteínas foi determinada utilizando o protocolo de BRADFORD (1976).

As amostras foram fracionadas para a corrida em gel de acrilamida (60mg de proteína por poço) usando gel de Tris-HCl 10-12% em voltagem de 100mV, por 1 hora. As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose/PVDF por 1 hora, em 100mV. Após 15 minutos de bloqueio em leite 10% em TBS-T, as membranas foram incubadas de um dia para o outro com anticorpos para neurofilamento-200 (1:6.000, Sigma), GFAP (1:30.000, Santa Cruz), laminina (1:1.000, Sigma), CD11b/c (1:1.000, Harlan Sera-Lab), tirosina hidroxilase (1:30.000, Sigma), nitro-tirosina (1:3.000, Abcam), sinaptofisina (1:1.000, Sigma) e alfa-tubulina (1:50.000, Sigma). Os anticorpos foram diluídos em 3% de leite ou 1% de soro fetal bovino em TBS-T. As membranas foram lavadas 2 vezes, por 10 minutos cada, com TBS-T e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-coelho (1:10.000, Amersham) ou anti-camundongo (1:6.000, Amersham), conjugados com peroxidase. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBS-T 2 vezes, por 10 minutos cada, e 1 vez em TBS. Após a última lavagem, as membranas foram incubadas com quimioluminescente (Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus, ECL kit, PerkinElmer Life Science, USA) por 1 minuto. As membranas foram expostas então a um filme fotográfico (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, USA) para a visualização das bandas de proteína. Os

filmes foram quantificados através de densitometria óptica, usando sistema específico de análise de imagens (Imaging Research Inc., Brock University, Canadian, model M4/SK/ALU). A intensidade de luz que atravessa o filme, numa região fora da membrana, foi fixada em 200 unidades densitométricas (arbitrárias), e o valor da marcação inespecífica foi tomado de uma região próxima a cada banda correspondente às proteínas de interesse. Desta forma, a marcação específica foi o resultado da subtração do valor inespecífico pelo valor correspondente à marcação das bandas. A normalização da densidade foi feita dividindo-se o valor da densidade das proteínas pelo valor da alfa-tubulina.

3.11. Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos foram analisados estatisticamente através do teste t de Student e análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, dependendo do caso. A análise estatística foi feita utilizando-se o programa GraphPad Prism, versão 4.00, para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Foram aceitas como variações significativas aquelas em que a diferença entre os grupos resultou em um p menor que 0,05.

4-RESULTADOS

4.1. Treinamento físico dos animais

Após 7 semanas de treinamento físico em rodas de corrida espontânea, podemos definir o perfil de corrida dos ratos lesados tratados com nicotina e dos ratos lesados tratados com placebo. Durante o ciclo escuro de 12 horas, os ratos do grupo nicotina obtiveram a média percorrida, por semana, de 4.171,7 metros; já os ratos do grupo placebo obtiveram a média percorrida, por semana, de 1.261,1 metros. Os dados mostram que, a partir da segunda semana de treinamento, o grupo nicotina correu significativamente mais que o grupo placebo, e que esta diferença se manteve até o fim do período de treinamento. Foi observado também que a quantidade de metros percorrida pelo grupo nicotina aumentou significativamente a partir da segunda semana e se manteve até o final do período de treinamento.

A Tabela 02 mostra os valores agregados, semanalmente, dos grupos treinados.

Tabela 02: Valores médios das distâncias percorridas pelos animais ao longo das semanas de treinamento nas rodas de corrida espontânea.

	Nicotina Treinado	Placebo Treinado
1º Semana	1.392,0 ± 382,0#	885,9 ± 183,6**
2º Semana	4.037,0 ± 1.976,0	1.182,0 ± 374,0**
3º Semana	4.264,0 ± 1.785,0	1.458,0 ± 232,6**
4º Semana	4.233,0 ± 1.752,0	1.428,0 ± 186,9**

5ª Semana	3.853,0 ± 884,6	1.325,0 ± 197,3**
6ª Semana	5.675,0 ± 1.646,0	1.453,0 ± 372,2**
7ª Semana	5.748,0 ± 2.643,0	1.096,0 ± 225,1**

Valores expressos em metros (m) como média ± erro padrão da média e analisados pelo teste *t* de Student e ANOVA de medidas repetidas. ***p*<0,01 difere do grupo nicotina treinado e #*p*<0,05 difere das subsequentes semanas no grupo Nicotina-Treinado. *n*=7.

4.2. Concentração de nicotina e cotinina plasmáticas

Através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi demonstrado que o tratamento com nicotina foi eficiente. Tanto a nicotina quanto seu metabólito, a cotinina, foram encontrados apenas no sangue dos ratos tratados com a droga, não aparecendo em amostras de plasma de ratos tratados com placebo (Fig. 2), sendo que a concentração média de nicotina e cotinina no plasma dos animais tratados foi, respectivamente, de 32±11ng/ml e 0,92±0,28ng/ml.

FIGURA 02: Cromatogramas representativos ilustrando o perfil das curvas de absorvância da nicotina (1), cotinina (2) e acetanilida (3) em ratos tratados com placebo (A) ou nicotina (B).

4.3. Lesão estriatal dopaminérgica

A injeção da neurotoxina 6-OHDA causou uma denervação parcial do sistema nigro-estriatal, indicada por imunohistoquímica (Fig. 03), e confirmada pela acinesia observada nos ratos lesionados na realização do teste “adjusting step”, além das diminuições encontradas no RNAm e na proteína da tirosina hidroxilase, no mesencéfalo ventral e no corpo estriado dos ratos (Fig. 04), quando comparados com o grupo Sham.

FIGURA 03: Imunohistoquímica com o anticorpo para a tirosina hidroxilase em cortes do corpo estriado e do mesencéfalo ventral. Efeitos da injeção estriatal de 6-OHDA. A: corpo estriado contralateral; B: corpo estriado ipsilateral; C: mesencéfalo ventral contralateral; D: mesencéfalo ventral ipsilateral.

FIGURA 04: Sham = sham, Pla-Sed = placebo sedentário, Pla-Trei = placebo treinado, Nic-Sed = nicotina sedentário e Nic-Trei = nicotina treinado. Efeito do tratamento crônico com nicotina e da atividade física espontânea por 7 semanas, na quantidade de proteína (A e B) e mRNA (C e D) da tirosina hidroxilase no mesencéfalo ventral e corpo estriado dos ratos, respectivamente. Valores expressos como media $\pm$ erro padrão da média e analisados pelos testes de ANOVA de uma via (B e C) e de duas vias (A e D). A: * $p < 0,05$ difere do Sham; B: ** $p < 0,01$ difere do Sham e [#] $p < 0,01$ difere do Nic-Trei; C: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ diferem do Sham e ^{##} $p < 0,05$ difere do Nic-Trei; D: *** $p < 0,001$ difere de todos os outros grupos. A: Sham e Nic-Trei, $n = 4$, Pla-Sed, $n = 5$, Pla-Trei e Nic-Sed, $n = 6$; B: Sham, $n = 6$, Pla-Sed, Pla-Trei e Nic-Trei, $n = 5$, Nic-Sed, $n = 7$; C e D: $n = 3$.

4.4. Análise comportamental

Após a injeção da neurotoxina, o desempenho da pata dianteira contralateral à lesão foi seriamente prejudicado, nos grupos

sedentários (com ou sem administração de nicotina), no teste “adjusting step”, comparativamente ao teste pré-lesão e ao grupo Sham. Esse prejuízo foi visto através do arraste da pata em questão na madeira, ao invés de ajustes de passos, quando os ratos são movidos para os lados pelo experimentador.

Por outro lado, os dois grupos treinados em rodas de correr (placebo e nicotina) não mostraram prejuízo na pata dianteira contralateral à lesão (Fig. 05).

FIGURA 05: Sham = sham, Pla-Sed = placebo sedentário, Pla-Trei = placebo treinado, Nic-Sed = nicotina sedentário e Nic-Trei = nicotina treinado. Efeito do tratamento crônico com nicotina e da atividade física espontânea por 7 semanas, no teste “adjusting step” antes (Pré) e após (Pós 1 e Pós 2) a lesão estriatal de 6-OHDA. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste ANOVA de duas vias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ difere do Sham; # $p < 0,001$ difere do Pós1 e do Pós2; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ difere dos respectivos grupos sedentários. Sham, $n=8$; Pla-Trei e Nic-Trei, $n=7$; Pla-Sed, $n=10$ e Nic-Sed, $n=11$.

Com a repetição dos testes, o grupo Sham mostrou um declínio no número de ajustes no passo, sugerindo algum grau de habituação ao teste (como observado na literatura). A nicotina parece reduzir mais profundamente o número de ajustes de passos, quando comparada ao grupo placebo (ambos sedentários), contudo, nos grupos treinados, a nicotina parece não ter efeito na quantidade de ajustes de passos.

4.5. Inflamação e fatores neurotróficos

Procuramos verificar também algum grau de inflamação que possa ter ocorrido após a lesão com 6-OHDA no corpo estriado. Contudo, não verificamos alterações na quantidade de proteínas para marcadores exclusivos de células gliais (GFAP e OX-42), bem como para marcador de inflamação/dano celular (nitrotirosina). Isso provavelmente ocorreu por causa do longo período entre a infusão da droga e a eutanásia dos ratos (5 semanas) (Fig. 6).

Além disso, não foi verificada alteração, após a lesão com 6-OHDA, na expressão de RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro e do fator de crescimento do fibroblasto. Porém, o tratamento crônico com nicotina associado à atividade física espontânea aumentou a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro tanto no corpo estriado quanto no mesencéfalo ventral. O fator de crescimento do fibroblasto, por outro lado mostrou um aumento na expressão do RNAm no mesencéfalo ventral somente no

grupo treinado, mas esse aumento não foi observado no corpo estriado (Fig. 7). Nenhuma alteração significativa na expressão do RNAm do fator neurotrófico derivado da glia foi observada.

FIGURA 06: Sham = sham, Pla-Sed = placebo sedentário, Pla-Trei = placebo treinado, Nic-Sed = nicotina sedentário e Nic-Trei = nicotina treinado. Efeito do tratamento crônico com nicotina e da atividade física espontânea por 7 semanas na quantidade de proteína do GFAP, do OX-42 e da nitrotirosina no corpo estriado dos ratos. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelos testes de ANOVA de uma via. Não foi visualizada nenhuma diferença significativa. A: Sham, Nic-Sed e Nic-Trei, n=4, Pla-Sed e Pla-Trei, n=5; B: Sham, n=5, Pla-Sed, Pla-Trei, Nic-Sed e Nic-Trei, n=4; C: Sham, Pla-Sed, Nic-Sed e Nic-Trei, n=3, Pla-Trei, n=4.

4.6. Neuroproteção dos terminais dopaminérgicos

Semelhante à proteína da tirosina hidroxilase no estriado foi visto uma diminuição da proteína do neurofilamento-200 em todos os grupos lesionados com 6-OHDA, exceto o grupo nicotina treinado, o qual manteve a quantidade desta proteína nos mesmos níveis do grupo Sham (Fig. 8).

FIGURA 07: Sham = sham, Pla-Sed = placebo sedentário, Pla-Trei = placebo treinado, Nic-Sed = nicotina sedentário e Nic-Trei = nicotina treinado. Efeito do tratamento crônico com nicotina e da atividade física espontânea por 7 semanas na quantidade de RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro (A e B) e do fator de crescimento do fibroblasto (C e D) no mesencéfalo ventral e corpo estriado dos ratos, respectivamente. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média e analisados pelo teste ANOVA de duas vias. A: $**p < 0,01$ difere do Sham e do Nic-

Sed e $^{###}p<0,001$ difere do Pla-Trei; B: $^{*}p<0,05$ difere do Sham, $^{**}p<0,01$ difere do Nic-Sed e $^{##}p<0,01$ difere dos seus respectivos nicotinas; C: $^{**}p<0,01$ difere do Sham, $^{#}p<0,01$ difere do Pla-Sed e $^{##}p<0,001$ difere do Pla-Trei. $n=3$.

Esse resultado, junto com o aumento do RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro nos leva a pensar em uma associação entre o neurofilamento-200 e o fator neurotrófico derivado do cérebro na restauração dos níveis normais de tirosina hidroxilase no corpo estriado, em ratos treinados e tratados com nicotina.

FIGURA 08: Sham = sham, Pla-Sed = placebo sedentário, Pla-Trei = placebo treinado, Nic-Sed = nicotina sedentário e Nic-Trei = nicotina treinado. Efeito do tratamento crônico com nicotina e da atividade física espontânea por 7 semanas na quantidade de proteínas da laminina, da sinaptofisina e do neurofilamento-200 (NF-200) no corpo estriado dos ratos. Valores expressos como media $\pm$ erro padrão da

média e analisados pelo teste ANOVA de uma via. C: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ diferem do Sham, # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ diferem do Nic-Trei. A: $n=4$; B: Sham, Pla-Trei, Nic-Sed e Nic-Trei, $n=5$, Pla-Sed, $n=4$; C: Sham, Pla-Sed e Nic-Trei, $n=3$, Pla-Trei, $n=4$, Nic-Sed, $n=5$.

Também não foram observadas alterações na quantidade de proteína da laminina, sugerindo que não houve reestruturação de vasos sanguíneos e/ou angiogênese e da sinaptofisina, sugerindo que, ao final do período experimental, não houve diferença significativa intergrupos quanto a quantidade de terminais sinápticos no corpo estriado indicando que, se houve perda de terminais sinápticos após a lesão, esta não pode ser observada após o período experimental, provavelmente devido às intervenções metodológicas aplicadas (Fig. 7).

5-DISSCUSSÃO

É normal que certa quantidade de neurônios dopaminérgicos (em torno de 5% a cada década) morra durante o processo de envelhecimento (FEARNLEY e LEES, 1991; McGEER *et al.*, 1989), porém na doença de Parkinson ocorre uma perda patológica acelerada destes neurônios e os sintomas motores surgem quando ocorre uma diminuição entre 70 a 80% de dopamina estriatal e perda de mais de 60% de neurônios dopaminérgicos da substância negra (FEARNLEY e LEES, 1991; McGEER *et al.*, 1989), sendo esta perda progressiva e rápida, podendo ser de 45% dos neurônios por década (DUNNET e BJÖRKLUND, 1994).

Os mecanismos que levam a esta grande perda neuronal na doença não foram completamente elucidados, porém pesquisas indicam que o estresse oxidativo, disfunções mitocondriais, excitotoxicidade, desequilíbrio na homeostasia de cálcio, processos inflamatórios, apoptose (DUNNET e BJÖRKLUND, 1994), fatores genéticos e ambientais (YOU DIM e RIEDERER, 1997) podem estar envolvidos.

5.1- Lesão estriatal dopaminérgica

A principal característica da doença de Parkinson no encéfalo é a falta de dopamina liberada no corpo estriado, causada pela morte de células dopaminérgicas da substância negra.

A dopamina é considerada citotóxica após o seu metabolismo, seja por auto-oxidação através da monoamina-oxidase ou por

metabolismo enzimático via catecol-metil-transferase. Isso leva à formação de espécies reativas de oxigênio, sugerindo que a toxicidade dopaminérgica pode contribuir para a morte celular nigral, com consequente progressão da doença de Parkinson (COLEBROOKE *et al.*, 2006).

Além disso, sabe-se que a 6-OHDA pode ser formada no encéfalo através da hidrólise da dopamina na presença de Fe^{2+} e H_2O_2 .

A 6-OHDA, após ser injetada no encéfalo, entra nas células dopaminérgicas através dos transportadores de dopamina e é oxidada. Isto leva ao estresse oxidativo e à produção de espécies reativas de oxigênio, que possuem efeitos diretos no complexo I da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, ocasionando a destruição dos terminais sinápticos e morte celular.

No presente estudo, observamos que a injeção da neurotoxina 6-OHDA causou uma denervação parcial do sistema nigro-estriatal, indicada por imunohistoquímica (Fig. 03), pela quantificação do RNAm e da proteína da tirosina hidroxilase no mesencéfalo ventral e no corpo estriado dos ratos (Fig. 04), além do teste “adjusting step” (Fig. 05), indicando que o modelo de parkinsonismo proposto foi bem realizado.

5.2- Análise comportamental

A atividade física voluntária em rodas de correr por 1 semana antes e duas semanas após a injeção de 6-OHDA no feixe nigro-estriatal de ratos, é capaz de abolir a rotação contralateral induzida pela injeção de apomorfina (MABANDLA *et al.*, 2004; HOWELLS *et al.*, 2005).

Por outro lado, MOROZ e colaboradores (2004) mostraram que a atividade física voluntária em rodas de correr antes de injeções intracerebrais de 6-OHDA não promove proteção contra subsequentes problemas no uso das patas dianteiras dos ratos.

O teste comportamental “adjusting step” é simples e pode ser usado para avaliar uma possível eficácia de tratamentos para restaurar a função dopaminérgica. Além disso, é considerado o mais sensível para verificação da depleção de dopamina no sistema nigro-estriatal, sem a necessidade de utilização/indução de drogas (CHANG, 1999).

No presente estudo, foi visto que a atividade física voluntária, iniciando-se 2 semanas antes da injeção intra-estriatal de 6-OHDA e continuando por mais 5 semanas após a lesão, promoveu proteção contra os prejuízos motores apresentados por ratos sedentários através do teste “adjusting step”.

No entanto, nenhuma melhora foi vista em relação ao tratamento crônico com nicotina, sem exercícios físicos, sugerindo

que a atuação da atividade física espontânea, de alguma forma, está além dos efeitos causados pelo tratamento crônico com nicotina.

Podemos enfatizar com esses resultados de a atividade física poder trazer benefícios à evolução de doenças neurodegenerativas, como sugeridas anteriormente (SMITH e ZIGMOND, 2003). No geral, estudos com terapias físicas têm obtido melhoras significativas e estáveis com a caminhada, velocidade de marcha, habilidade e atividades da vida diária (BAATILE *et al.*, 2000; DE GOEDE *et al.*, 2001) na doença de Parkinson.

Existe a possibilidade da compensação do dano dopaminérgico induzido pela atividade física não ser mediada localmente dentro do corpo estriado, mas fora dele, através de aumento na atividade do circuito tálamo-córtico-estriatal (O'DELL *et al.*, 2007).

5.3- Tratamento crônico com nicotina

Há décadas é conhecido que a nicotina atravessa a barreira hematoencefálica, sendo capaz de interagir com núcleos encefálicos (IZQUIERDO e IZQUIERDO, 1971; RIAH *et al.*, 1998).

A administração da nicotina através de pastilhas implantadas subcutaneamente permite a infusão contínua e constante de concentrações pré-estabelecidas da droga. Este método evita picos irregulares de liberação de catecolaminas e outras substâncias no sistema vascular possibilitando a análise adequada da modulação de sistemas de neurotransmissão pela nicotina (FERRARI, 2006).

Com a quantificação da nicotina e cotinina plasmáticas através do HPLC, pudemos inferir que o tratamento crônico com nicotina mostrou-se eficiente no que diz respeito à quantidade de nicotina liberada pela pastilha implantada nos ratos durante todo o período do experimento.

Estudos descreveram a liberação de DA após a administração de nicotina (KULAK *et al.*, 1997; KAISER *et al.*, 1998). É importante ressaltar que este estudo sugere que os efeitos da nicotina podem ser relevantes em tratamentos farmacológicos, uma vez que produziram efeitos robustos sobre o comportamento motor de ratos. Assim, agonistas nicotínicos possivelmente apresentam um efeito benéfico no tratamento dos sintomas da doença de Parkinson por promover a liberação de DA nos terminais não lesados.

Teoricamente este efeito poderia ser mais benéfico nos estágios iniciais da doença, onde o paciente ainda apresenta um percentual maior de fibras dopaminérgicas preservadas, mas a falta de efeito em ratos com lesão com MPTP, que mimetiza as fases iniciais da doença, sugere que um efeito mais robusto pode ser observado mesmo nas fases avançadas da doença (KOUZMINE, 2004).

Os tratamentos com nicotina ou agonistas desta *in vivo*, mostram aumentos regionais de fatores neurotróficos, como o fator de crescimento do fibroblasto (BELLUARDO *et al.*, 1998; BELLUARDO *et al.*, 1999a,b).

Contudo, nosso tratamento com nicotina não mostrou qualquer alteração em relação à tirosina hidroxilase e fatores neurotróficos, que levasse a neuroproteção do sistema nigro-estriatal dopaminérgico, no que diz respeito à síntese de dopamina na via, exibindo alterações em alguns parâmetros somente quando agindo em conjunto com a atividade física espontânea.

A nicotina sistêmica parece ter aumentado a síntese de tirosina hidroxilase nos neurônios nigrais de modo indistinto nos grupos sedentários e treinados, mas que este efeito refletiu-se apenas como aumento da enzima nos terminais dopaminérgicos do corpo estriado do grupo nicotina treinado, o que é um indicativo indireto de neuroproteção daqueles terminais.

QUIK e DI MONTE (2001) sugerem que a terapia com nicotina reduz o dano nigroestriatal pela estimulação da liberação de dopamina, a qual pode competir com a neurotoxina pela entrada nos terminais nervosos. Com poucas toxinas nos terminais, é esperado que haja um menor dano celular nos neurônios.

Além disso, a nicotina pode agir como antioxidante (OBATA *et al.*, 2002; SOTO-OTERO *et al.*, 2002) e/ou inibir o complexo I da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, com consequente redução nos níveis de espécies reativas de oxigênio (CORMIER *et al.*, 2003).

No entanto, a falta de alterações promovidas pela administração crônica de nicotina que poderiam levar à

neuroproteção do sistema nigro-estriatal nos leva a crer que a dose utilizada, associada ao tipo de tratamento contínuo escolhido, não afeta de maneira positiva a maquinaria das células neuronais dos núcleos encefálicos estudados, bem como não participa na melhora de padrões comportamentais.

5.4- Atividade física espontânea

A atividade física possui efeitos neuroprotetores. Esses efeitos são mais bem definidos com respeito à redução de injúria no cérebro (COTMAN *et al.*, 2007) e na medula espinal (ANDRADE *et al.*, 2010). Contudo, os mecanismos que formam a base dos aspectos positivos da atividade física na neurodegeneração estão apenas no início das investigações em modelos animais.

Não se sabe ao certo como a atividade física leva à neuroproteção. No entanto, sabe-se que ela aumenta a liberação de neurotrofinas que podem ser neuroprotetoras em áreas com algum comprometimento (MABANDLA *et al.*, 2004).

A atividade física também aumenta o aporte de oxigênio para os tecidos, limitando assim a hipóxia, ou aumentando a remoção de neurotoxinas da substância negra e do corpo estriado (MABANDLA *et al.*, 2004).

Clinicamente, pacientes com a doença de Parkinson não são capazes de atuar em programas de exercícios forçados. Por isso, o

exercício voluntário pode ter um papel como adjunto terapêutico funcional no início da doença (O'DELL *et al.*, 2007).

Nossos resultados indicam que, apesar de a atividade física espontânea não ter alterado padrões intracelulares favoráveis à neuroproteção do sistema nigro-estriatal, ela contribuiu para a melhora da acinesia das patas dianteiras dos ratos, como observado pelo teste comportamental "adjusting step".

Qualquer que seja o motivo, a atividade física mostrou-se benéfica em aliviar os efeitos 6-OHDA na habilidade motora dos ratos, através da possível indução de plasticidade em áreas não estudadas e que regulam o comportamento motor, como o córtex pré-frontal.

HOWELS e colaboradores (2005) sugerem que a atividade física voluntária pode ter efeitos de longa duração, possivelmente devido à ativação de transcrição gênica e liberação de fatores neurotróficos. Esta descrição concorda com outros, mostrando que a atividade física também é um potente indutor de neuroplasticidade no sistema nervoso central.

É possível que a atividade física tenha exercido efeitos de neuroplasticidade morfológica e química em áreas do córtex cerebral que trabalham em associação com os gânglios da base. Esse é um interessante assunto a ser avaliado nos próximos trabalhos que seguem a este.

5.5- Inflamação e fatores neurotróficos

Alguns pesquisadores sugerem que o efeito neurotóxico da 6-OHDA continua a causar apoptose por um período que pode ir de 2 semanas a aproximadamente 28 dias após a lesão (BJORKLUND *et al.*, 1997).

No sistema nervoso central depois de uma injúria, seja ela resultado de um trauma, doença, insulto químico ou desordens genéticas, os astrócitos ficam reativos e respondem de maneira típica, processo chamado de astrogliose. A astrogliose é caracterizada pela rápida síntese de GFAP nestas células (PENKY *et al.*, 1999; ENG *et al.*, 2000).

Atualmente reconhece-se que a glia modula a função neuronal de forma dinâmica, em condições fisiológicas e patológicas, além de fornecer uma função de suporte ao funcionamento dessas células.

Após o insulto tóxico, é esperada a ativação de microglia tanto no corpo estriado quanto na substância negra. As microglias agem como fornecedores de nutrientes, tampões metabólicos e como detoxificadores (ROBBINS e COTRAN, 2005). Podem atuar removendo as células mortas e retirando o excesso de toxinas do local, além de liberarem fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do cérebro e o fator neurotrófico derivado da glia, além de possuírem altos níveis de glutathione, um importante antioxidante do sistema nervoso central (JUURLINK, 1997).

Sugere-se também que os astrócitos atuam na modulação trófica do reparo neuronal e re-crescimento de axônios após lesão, na liberação de citocinas mediadoras de dor (WIESELER-FRANK *et al.*, 2004) e na modulação da neuroinflamação presente em várias patologias do sistema nervoso central (BAJETTO *et al.*, 2001; KIELIAN e ESEN, 2004).

A falta de alterações em marcadores de inflamação e de células gliais ocorrida neste experimento poderia ser, em parte, explicada pela obtenção dos tecidos depois de decorridas cinco semanas pós-lesão com 6-OHDA, tempo no qual pode ter havido restabelecimento da expressão dessas proteínas, até os níveis basais.

Os resultados obtidos também mostraram que a atividade física aumentou a quantidade de RNAm do fator de crescimento do fibroblasto no mesencéfalo ventral e diminuiu a quantidade de RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro no corpo estriado, o que sugere não haver quaisquer proteções neuronais contra o insulto neurotóxico causado pela injeção de 6-OHDA.

5.6- Neuroproteção dos terminais dopaminérgicos

Se a neurogênese e/ou neuroproteção podem ser promovidas no corpo estriado de pessoas que sofrem da doença de Parkinson por um protocolo de atividade física, isso sugere que esta pode ser muito benéfica para atenuar o progresso da doença (MABANDLA *et al.*, 2004).

Por outro lado, a associação de tratamento crônico com nicotina e atividade física espontânea mostrou proteção contra a perda de habilidade motora, proteção na depleção dopaminérgica no corpo estriado, o que pode estar associada ao aumento da expressão do RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro no mesencéfalo ventral e no corpo estriado, assim como na manutenção dos níveis de proteína do neurofilamento-200, um marcador de citoesqueleto do terminal neuronal presente no corpo estriado.

Os neurofilamentos determinam o calibre axonal, auxiliam na manutenção da morfologia neuronal e participam do transporte axonal de metabólitos do corpo celular até os terminais sinápticos (KIRKPATRICK e BRADY, 1999; ELDER *et al.*, 1999). Esses são sintetizados no corpo celular e transportados para o axônio, através da fosforilação (ACKERLEY *et al.*, 2000; JUNG *et al.*, 2000).

Desta forma, o efeito da atividade física espontânea associada com a nicotina, mantendo os níveis basais de neurofilamento-200 é um indicativo de reação plástica de neurônios nigrais (dopaminérgicos) e corticais (colinérgicos) que se projetam para o corpo estriado (ANDRADE *et al.*, 2010).

Os resultados do aumento dos níveis de neurofilamento-200 no grupo nicotina treinado em relação aos demais grupos lesados, à luz dos resultados dos níveis protéicos da tirosina hidroxilase estriatal e aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro no corpo estriado deste grupo, reforça a ação da nicotina associada a

atividade física no parkinsonismo experimental pela 6-OHDA estriatal. Este efeito pode ter recebido a influência da maior expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro neste grupo.

Essas discussões acima, sobre as ações neuroprotetoras da associação nicotina/atividade física vão de encontro à ausência de efeito na quantidade de sinaptofisina no grupo nicotina treinado, indicando que no corpo estriado o efeito da associação foi mais neuroprotetiva e possivelmente menos neuroplástica.

6-CONCLUSÃO

- A lesão estriatal dopaminérgica utilizada no estudo foi eficiente, evidenciando uma queda, tanto na quantidade de proteína quanto na expressão de RNAm da tirosina hidroxilase no corpo estriado e no mesencéfalo ventral dos ratos, além de levá-los a uma perda da capacidade de movimentos da pata dianteira contralateral à lesão.

- A atividade física espontânea, com ou sem tratamento de nicotina, recupera a capacidade de movimentos da pata dianteira contralateral à lesão dos ratos.

- A associação de tratamento crônico com nicotina à atividade física espontânea parece proteger os terminais dopaminérgicos estriatais, já que foi evidenciada a manutenção das concentrações de proteínas da tirosina hidroxilase e do neurofilamento-200 no corpo estriado.

- Esta possível proteção causada pela associação do tratamento crônico com nicotina à atividade física espontânea pode estar relacionada ao aumento da expressão do RNAm do fator neurotrófico derivado do cérebro, observado no corpo estriado e no mesencéfalo ventral.

- Não foram observados indícios de neoformação sináptica, de angiogênese e de inflamação, bem como de alterações relativas a células gliais, ativadas ou não, no corpo estriado dos ratos.

BIBLIOGRAFIA

ACKERLEY S, GRIERSON AJ, BROWNLEES J, THORNHIEL P, ANDERTON BH, LEIGHT PN, SHEW CE, MEILERCCJ. Glutamate slow axonal transport of neurofilament in transfected neurons. **J Cell Biol.** 2000 150:165-175.

ANDRADE MS, MENDONÇA LM, CHADI G. Treadmill running protects spinal cord contusion from secondary degeneration. **Brain Res.** 2010 Jul 30; 1345:266-78.

BAATILE J, LANGBEIN WE, WEAVER F, MALONEY C, JOST MB. Effect of exercise on perceived quality of life of individuals with Parkinson's disease. **J Rehabil Res Dev.** 2000 Sep-Oct;37(5):529-34.

BAJETTO A, BONAVALIA R, BARBERO S, FLORIO T, SCHETTINI G. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol.* 2001 22:147-184.

BALLABRIGA J, POZAS E, PLANAS AM, FERRER I. bFGF and FGFR-3 immunoreactivity in the rat brain following systemic kainic acid administration at convulsant doses: localization of bFGF and FGFR-3 in reactive astrocytes, and FGFR-3 in reactive microglia. **Brain Res.** 1997 Mar 28;752(1-2):315-8.

BELLUARDO N, BLUM M, MUDO G, ANDBJER B, FUXE K. Acute intermittent nicotine treatment produces regional increases of basic fibroblast growth factor messenger RNA and protein in the tel- and diencephalon of the rat. **Neuroscience**. 1998 Apr;83(3):723-40.

BELLUARDO N, MUDÒ G, BLUM M, CHENG Q, CANIGLIA G, DELL'ALBANI P, FUXE K. The nicotinic acetylcholine receptor agonist (+/-)-epibatidine increases FGF-2 mRNA and protein levels in the rat brain. **Brain Res Mol Brain Res**. 1999 Dec 10;74(1-2):98-110 a.

BELLUARDO N, MUDO G, BLUM M, FUXE K. Central nicotinic receptors, neurotrophic factors and neuroprotection. **Behav Brain Res**. 2000 Aug;113(1-2):21-34.

BELLUARDO N, MUDÒ G, CANIGLIA G, CHENG Q, BLUM M, FUXE K. The nicotinic acetylcholine receptor agonist ABT-594 increases FGF-2 expression in various rat brain regions. **Neuroreport**. 1999 Dec 16;10(18):3909-13 b.

BJÖRKLUND A, ROSENBLAD C, WINKLER C, KIRIK D. Studies on neuroprotective and regenerative effects of GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**. 1997 4(3-4):186-200.

BORDIA T, PARAMESWARAN N, FAN H, LANGSTON JW, MCINTOSH JM, QUIK M. Partial recovery of striatal nicotinic receptors in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) - lesioned monkeys with chronic oral nicotine. **J Pharmacol Exp Ther.** 2006 Oct;319(1):285-92.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 1976 v. 72, p. 248-54.

BUI LM, KEEN CL, DUBICK MA. Influence of 12-week nicotine treatment and dietary copper on blood pressure and indices of the antioxidant system in male spontaneous hypertensive rats. **Biol. Trace. Elem. Res.** 1994 Oct-Nov;46(1-2):67-78.

CHAMPTIAUX N, GOTTI C, CORDERO-ERAUSQUIN M, DAVID DJ, PRZYBYLSKI C, LENA C, CLEMENTI F, MORETTI M, ROSSI FM, LE NOVERE N, MCINTOSH JM, GARDIER AM, CHANGEUX JP. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. **J Neurosci.** 2003 Aug 27;23(21):7820-9.

CHANG JW, WACHTEL SR, YOUNG D, KANG UJ. Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models

of Parkinson's disease: studies on medial forebrain bundle and striatal lesions. **Neuroscience**. 1999 Jan;88(2):617-28.

CLAUS P, WERNER S, TIMMER M, GROTHE C. Expression of the fibroblast growth factor-2 isoforms and the FGF receptor 1-4 transcripts in the rat model system of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**. 2004 Apr 29;360(3):117-20.

COLEBROOKE RE, HUMBY T, LYNCH PJ, MCGOWAN DP, XIA J, EMSON PC. Age-related decline in striatal dopamine content and motor performance occurs in the absence of nigral cell loss in a genetic mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**. 2006 Nov;24(9):2622-30.

CORMIER A, MORIN C, ZINI R, TILLEMENT JP, LAGRUE G. Nicotine protects rat brain mitochondria against experimental injuries. **Neuropharmacology**. 2003 Apr;44(5):642-52.

COTMAN CW, BERCHTOLD NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends. Neurosci**. 2002 Jun;25(6):295-301.

COTMAN CW, BERCHTOLD NC, CHRISTIE LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends Neurosci.** 2007 Sep;30(9):464-72.

COTMAN CW, ENGESSER-CESAR C. Exercise enhances and protects brain functions. **Exerc. Sport Sci. Rev.** 2002 v. 30(2), p. 75-79.

CRIZZLE AM, NEWHOUSE IJ. Is physical exercise beneficial for persons with Parkinson's disease? **Clin J Sport Med.** 2006 Sep;16(5):422-5.

DANI JA, BERTRAND D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** 2007 47:699-729.

DE GOEDE CJ, KEUS SH, KWAKKEL G, WAGENAAR RC. The effects of physical therapy in Parkinson's disease: a research synthesis. **Arch Phys Med Rehabil.** 2001 Apr;82(4):509-15.

DEUMENS R, BLOKLAND A, PRICKAERTS J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp Neurol.** 2002 Jun;175(2):303-17.

DISHMAN RK. Brain monoamines, exercise, and behavioral stress: animal models. **Med. Sci. Sports Exerc.** 1997 Jan;29(1):63-74.

DUNNETT SB, BJÖRKLUND A. (1994) Functional neural transplantation. New York, Lippincott-Raven Publishers.

ELDER GA, FRIEDRICH VL, MARGITA A, LAZZARINE A. Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in mid-sized neurofilament subunit. **J Cell Biol.** 1999 146:181-192.

EMOTO N, GONZALEZ AM, WALICKE PA, WADA E, SIMMONS DM, SHIMASAKI S, BAIRD A. Basic fibroblast growth factor (FGF) in the central nervous system: identification of specific loci of basic FGF expression in the rat brain. **Growth Factors.** 1989 2(1):21-9.

ENDO M, PULSINELLI WA, WAGNER JA. Transient global ischemia induces dynamic changes in the expression of bFGF and the FGF receptor. **Brain Res Mol Brain Res.** 1994 Mar;22(1-4):76-88.

ENG LF, GHIRNIKAR RS, LEE YL. Glial fibrillary acid protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). **Neurochem Res.** 2000 25: 1239-1451.

FEARNLEY J, LESS AJ. Parkinson's disease: Neuropathology. **Brain**. 1991 114: 2283-2301.

FERRARI MFR. Efeito modulatório da nicotina sobre a neurotransmissão em núcleos encefálicos responsáveis pelo controle cardiovascular em ratos geneticamente hipertensos e normotensos. Tese de doutorado apresentada no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2006.

FERREIRA SE, TUFIK S, MELLO MT. Neuroadaptação: uma proposta alternativa de atividade física para usuários de drogas em recuperação. **Rev. Bras. Ciên. e Mov**. 2001 9 (1):31-39.

FRANCOIS C, SAVY C, JAN C, TANDE D, HIRSCH EC, YELNIK J. Dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the normal state, in MPTP-treated monkeys, and in Parkinson's disease patients. **J Comp Neurol**. 2000 Sep 11;425(1):121-9.

FRIEDLAND RP, FRITSCH T, SMYTH KA, KOSS E, LERNER AJ, CHEN CH, PETOT GJ, DEBANNE SM. Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. 2001 Mar 13; 98(6):3440-5.

GLINKA Y, GASSEN M, YODIM MB. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **J Neural Transm Suppl.** 1997 50:55-66.

GOGGI J, PULLAR IA, CARNEY SL, BRADFORD HF. Modulation of neurotransmitter release induced by brain-derived neurotrophic factor in rat brain striatal slices in vitro. **Brain Res.** 2002 Jun 21;941(1-2):34-42.

GOMEZ-PINILLA F, DAO L, SO V. Physical exercise induces FGF-2 and its mRNA in the hippocampus. **Brain Res.** 1997 Aug 1;764(1-2):1-8.

GRONDIN R, GASH DM. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease. **J Neurol.** 1998 Nov;245(11 Suppl 3):P35-42.

GUILLIN O, DIAZ J, CARROLL P, GRIFFON N, SCHWARTZ JC, SOKOLOFF P. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. **Nature.** 2001 May 3;411(6833):86-9.

HARIHARAN M, VAN NOORD T, GREDEN JF. A high-performance liquid-chromatographic method for routine simultaneous

determination of nicotine and cotinine in plasma. **Clin Chem.** 1988 Apr;34(4):724-9.

HOWELLS FM, RUSSELL VA, MABANDLA MV, KELLAWAY LA. Stress reduces the neuroprotective effect of exercise in a rat model for Parkinson's disease. **Behav Brain Res.** 2005 Dec 7;165(2):210-20.

IZQUIERDO I, IZQUIERDO JA. Effects of drugs on deep brain centers. **Annu Rev Pharmacol.** 1971 ;11:189-208.

JUNG C, YABE JT, SHEA TB. C-terminal phosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit correlates with decrease neurofilament axonal transport velocity. **Brain Res.** 2000 856:12-19.

JUURLINK B. Response of glial cells to ischemia: roles of reactive oxygen species and glutathione. **Neurosci Biobehav Rev.** 1997 21:151-156.

KAISER AS, SOLIAKOV L, HARVEY SC, LUETJE CW, WONNACOTT S. Differential inhibition by α -conotoxin-MII of nicotinic stimulation of [3H] dopamine release from rat striatal synaptosomes and slices. **Journal of Neurochemistry.** 1998 70, 1069-1076.

KIELIAN T, ENSEN N. Effects of neuroinflammation on glia-glia gap junction intercellular communication: a perspective. **Neurochem Int.** 2004 45:429-436.

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 Aug;152(2):259-77.

KIRKPATRICK LL, BRADY ST. (1999) Cytoskeleton of neurons and glia. 6° ed. New York, Lippincott-Raven Publishers.

KOUZMINE I. Estudo de mecanismos dopaminérgicos, nicotínicos e adenosinérgicos em modelos de parkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina e MPTP em ratos. Dissertação de mestrado apresentada no Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2004.

KULAK JM, NGUYEN TA, OLIVEIRA BM, MCINTOSH JM. α -conotoxin-MII blocks nicotine-stimulated dopamine release in rat striatal synaptomes. **Journal of Neuroscience.** 1997 17, 5263-5270.

LIN LF, DOHERTY DH, LILE JD, BEKTESH S, COLLINS F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science**. 1993 May 21;260(5111):1130-2.

LIN LF, ZHANG TJ, COLLINS F, ARMES LG. Purification and initial characterization of rat B49 glial cell line-derived neurotrophic factor. **J Neurochem**. 1994 Aug;63(2):758-68.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. 2001 Dec;25(4):402-8.

LOPEZ-MARTIN E, CARUNCHO HJ, RODRIGUEZ-PALLARES J, GUERRA MJ, LABANDEIRA-GARCIA JL. Striatal dopaminergic afferents concentrate in GDNF-positive patches during development and in developing intrastriatal striatal grafts. **J Comp Neurol**. 1999 Apr 5;406(2):199-206.

LUNDY-EKMAN L. (2004) Neurociência: fundamentos para reabilitação. 2º Ed. Rio de Janeiro, Elsevier.

MABANDLA M, KELLAWAY L, ST CLAIR GIBSON A, RUSSELL VA. Voluntary running provides neuroprotection in rats after 6-

hydroxydopamine injection into the medial forebrain bundle. **Metab Brain Dis.** 2004 Jun;19(1-2):43-50.

MAGGIO R, RIVA M, VAGLINI F, FORNAI F, MOLTENI R, ARMOGIDA M, RACAGNI G, CORSINI GU. Nicotine prevents experimental parkinsonism in rodents and induces striatal increase of neurotrophic factors. **J Neurochem.** 1998 Dec;71(6):2439-46.

McARDLE WD, KATCH FI, KATCH VL. (1998) Fisiologia do exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano. 4º Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

McGEER PL, ITAGAKI S, AKIYAMA H, McGEER EG. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. **Annals of Neurology.** 1989 24:574-576.

McGEHEE DS, ROLE LW. Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. **Annu. Rev. Physiol.** 1995 57:521-46.

MEEUSEN R, DE MEIRLEIR K. Exercise and brain neurotransmission. **Sports Med.** 1995 Sep;20(3):160-88.

MEISSNER W, HILL MP, TISON F, GROSS CE, BEZARD E. Neuroprotective strategies for Parkinson's disease: conceptual limits of animal models and clinical trials. **Trends Pharmacol Sci.** 2004 May;25(5):249-53.

MIYAI I, FUJIMOTO Y, UEDA Y, YAMAMOTO H, NOZAKI S, SAITO T, KANG J. Treadmill training with body weight support: its effect on Parkinson's disease. **Arch Phys Med Rehabil.** 2000 Jul;81(7):849-52.

MOLTENI R, ZHENG JQ, YING Z, GÓMEZ-PINILLA F, TWISS JL. Voluntary exercise increases axonal regeneration from sensory neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2004 U S A., Jun 1;101(22):8473-8.

MOROZ IA, PECIÑA S, SCHALLERT T, STEWART J. Sparing of behavior and basal extracellular dopamine after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway in rats exposed to a prelesion sensitizing regimen of amphetamine. **Exp Neurol.** 2004 Sep;189(1):78-93.

MUDO G, BELLUARDO N, FUXE K. Nicotinic receptor agonists as neuroprotective/neurotrophic drugs. Progress in molecular mechanisms. **J Neural Transm.** 2007 Jan;114(1):135-47.

NAKAJIMA M, YAMAMOTO T, KUROIWA Y, YOKOI T. Improved highly sensitive method for determination of nicotine and cotinine in human plasma by high-performance liquid chromatography. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl.** 2000 May 26;742(1):211-5.

NEEPER, SA, GOMEZ-PINILLA F, CHOI J, COTMAN CW. Exercise and brain neurotrophins. **Nature.** 1995 Jan 12; 373 (6510):109.

NIEUWBOER A, DE WEERDT W, DOM R, TRUYEN M, JANSSENS L, KAMSMA Y. The effect of a home physiotherapy program for persons with Parkinson's disease. **J Rehabil Med.** 2001 Nov;33(6):266-72.

NYBERG P, NORDBERG A, WESTER P, WINDBLAD B. Dopaminergic deficiency is more pronounced in putamen than in nucleus caudatus in Parkinson's patients. **Neurochem Pathol.** 1983 1: 193-202.

OBATA T, AOMINE M, INADA T, KINEMUCHI H. Nicotine suppresses 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced hydroxyl radical generation in rat striatum. **Neurosci Lett.** 2002 Sep 13;330(1):122-4.

O'DELL SJ, GROSS NB, FRICKS AN, CASIANO BD, NGUYEN TB, MARSHALL JF. Running wheel exercise enhances recovery from nigrostriatal dopamine injury without inducing neuroprotection. **Neuroscience.** 2007 Feb 9;144(3):1141-51.

OLSSON M, NIKKHAH G, BENTLAGE C, BJORKLUND A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. **J Neurosci**. 1995 May;15(5 Pt 2):3863-75.

O'NEILL MJ, MURRAY TK, LAKICS V, VISANJI NP, DUTY S. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in acute and chronic neurodegeneration. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord**. 2002 Aug;1(4):399-411.

PALMER SS, MORTIMER JA, WEBSTER DD, BISTEVINS R, DICKINSON GL. Exercise therapy for Parkinson's disease. **Arch Phys Med Rehabil**. 1986 Oct;67(10):741-5.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**. 1986. Sidney.

PENKY M, JOHANSON CB, ELIASSON C, STAKEBERG J, WALLEN A, PERLMANN T, LENDAHL U, BETSHOLTZ C, BERTHOLD CH, FRIESEN J. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. **J Cell Biol**. 1999 145:503-514.

QUIK M. Smoking, nicotine and Parkinson's disease. **Trends Neurosci.** 2004 Sep;27(9):561-8.

QUIK M, BORDIA T, O'LEARY K. Nicotinic receptors at CNS targets for Parkinson's disease. **Biochem Pharmacol.** 2007 Oct 15;74(8):1224-34.

QUIK M, DI MONTE DA. Nicotine administration reduces striatal MPP+ levels in mice. **Brain Res.** 2001 Nov 2;917(2):219-24.

QUIK M, MCINTOSH JM. Striatal $\alpha 6^*$ nicotinic acetylcholine receptors: potential targets for Parkinson's disease therapy. **J Pharmacol Exp Ther.** 2006 Feb;316(2):481-9.

QUIK M, POLONSKAYA Y, KULAK JM, MCINTOSH JM. Vulnerability of 125I-alpha-conotoxin MII binding sites to nigrostriatal damage in monkey. **J Neurosci.** 2001 Aug 1;21(15):5494-500.

RIAH O, COURRIÈRE P, DOUSSET JC, TODESCHI N, LABAT C. Nicotine is more efficient than cotinine at passing the blood-brain barrier in rats. **Cell Mol Neurobiol.** 1998 Jun;18(3):311-8.

ROBBINS SL, COTRAN RS. (2005) Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 5º Ed. Rio de Janeiro, Elsevier.

ROSENBLAD C, KIRIK D, BJORKLUND A. Sequential administration of GDNF into the substantia nigra and striatum promotes dopamine neuron survival and axonal sprouting but not striatal reinnervation or functional recovery in the partial 6-OHDA lesion model. **Exp Neurol.** 2000 Feb;161(2):503-16.

ROSENBLAD C, KIRIK D, DEVAUX B, MOFFAT B, PHILIPS HS, BJORKLUND A. Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. **Eur J Neurosci.** 1999 May;11(5):1554-66.

SALMINEN O, MURPHY KL, MCINTOSH JM, DRAGO J, MARKS MJ, COLLINS AC, GRADY SR. Subunit composition and pharmacology of two classes of striatal presynaptic nicotinic acetylcholine receptors mediating dopamine release in mice. **Mol Pharmacol.** 2004 Jun;65(6):1526-35.

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 Mar;59(2):401-15.

SHEN RY, ALTAR CA, CHIODO LA. Brain-derived neurotrophic factor increases the electrical activity of pars compacta dopamine neurons in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1994 Sep 13;91(19):8920-4.

SIEGEL GJ, CHAUHAN NB. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. **Brain Res Brain Res Rev**. 2000 Sep;33(2-3):199-227.

SLOTKIN TA. Nicotine and the adolescent brain: insights from an animal model. **Neurotoxicol Teratol**. 2002 May-Jun;24(3):369-84.

SMITH AD, ZIGMOND MJ. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. **Exp Neurol**. 2003 Nov;184(1):31-9.

SOTO-OTERO R, MÉNDEZ-ALVAREZ E, HERMIDA-AMEIJEIRAS A, LÓPEZ-REAL AM, LABANDEIRA-GARCÍA JL. Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. **Biochem Pharmacol**. 2002 Jul 1;64(1):125-35.

SULZER D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends Neurosci**. 2007 May;30(5):244-50.

SUN M, KONG L, WANG X, LU X, GAO Q, GELLER AI. Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. **Brain Research**. 2005 May;1052 119 – 129.

TRUPP M, ARENAS E, FAINZILBER M, NILSSON AS, SIEBER BA, GRIGORIOU M, KILKENNY C, SALAZAR-GRUESO E, PACHNIS V, ARUMAE U. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. **Nature**. 1996 Jun 27;381(6585):785-9.

VAN HOOMISSEN JD, CHAMBLISS HO, HOLMES PV, DISHMAN RK. Effects of chronic exercise and imipramine on mRNA for BDNF after olfactory bulbectomy in rat. **Brain Res**. 2003 Jun 6;974(1-2):228-35.

WALKER DG, TERAU K, MATSUO A, BEACH TG, MCGEER EG, MCGEER PL. Immunohistochemical analyses of fibroblast growth factor receptor-1 in the human substantia nigra. Comparison between normal and Parkinson's disease cases. **Brain Res**. 1998 Jun 1;794(2):181-7.

WIESLER-FRANK J, MAIER SF, WATKINS LR. Glial activation and pathological pain. **Neurochem Int**. 2004 45:389-395.

YOUDIM MB, RIEDERER P. Understanding Parkinson's Disease. **Sci Am.** 1997 Jan;276(1):52-9.

ZAMBONI I, DE-MARTINO C. Buffered picric acid formaldehyde: a new rapid fixative for electron microscopy. **J Cell Biol.** 1967 35, 148A.

ZANARDI A, LEO G, BIAGINI G, ZOLI M. Nicotine and neurodegeneration in ageing. **Toxicol Lett.** 2002 Feb 28;127(1-3):207-15.

ZHOU FM, WILSON CJ, DANI JA. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. **J Neurobiol.** 2002 Dec;53(4):590-605.