PRISCILA CRESPO GARCIA

**O IMPACTO DO EXERCÍCIO FÍSICO A CURTO E A LONGO
PRAZO NA EVOLUÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON EM
RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

PRISCILA CRESPO GARCIA

**O IMPACTO DO EXERCÍCIO FÍSICO A CURTO E A LONGO
PRAZO NA EVOLUÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON EM
RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto G. Britto

Versão Original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

GARCIA, PRISCILA

O IMPACTO DO EXERCÍCIO FÍSICO A CURTO E A LONGO
PRAZO NA EVOLUÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS /
PRISCILA GARCIA; orientador Luiz Roberto Giorgetti
de Britto. -- São Paulo, 2016.
77 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Doença de Parkinson. 2. 6-Hidroxidopamina (6-
OHDA). 3. Exercício Físico. 4. Receptores de
Glutamato (AMPA). I. Giorgetti de Britto, Luiz
Roberto, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscila Crespo Garcia

Título da Tese: O impacto do exercício físico a curto e a longo prazo na evolução da doença de Parkinson em ratos

Orientador(a): Luiz Roberto Giorgetti de Britto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **113** nas fls. **133** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Luiz Roberto Giorgetti de Britto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Mecanismos compensatórios no modelo de Parkinson em ratos: Efeitos do exercício físico*" do qual participam o(s) aluno(s) **Priscila Crespo Garcia**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **14.09.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 19 de setembro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo grande amor, apoio, preocupações, incentivos, nunca deixando que a distância nos afastem.

Aos meus irmãos pelo simples fato de me amarem do meu jeito.

Ao meu marido lindo que tanto amo, pelo apoio e incentivo, por estar ao meu lado me ajudando, dando seu amor em todos os momentos.

À minha filha Ana Julia que me enche de alegria todos os dias, razão do meu passo adiante, me dá seu amor incondicional e faz de mim uma pessoa melhor.

Ao meu orientador, chefe e professor Britto, pelos ensinamentos, ajuda e paciência.

À Carol, por estar ao meu lado desde meu primeiro dia nesse laboratório, sempre disposta a me ajudar, pela paciência e carinho, além da grande amizade.

À Fernanda, pelos momentos de desconcentração e conversas, por sempre me “socorrer” quando precisei, pelo carinho, companheirismo e amizade.

À Andréa, pelas valiosas sugestões ao longo do trabalho e amizade.

Ao técnico do laboratório Adilson, pelos auxílios nos experimentos.

À minha banca de qualificação, Fernando, Cristóforo e Elisa, pelas importantes sugestões dadas ao meu estudo.

À todos os colegas de laboratório de Neurobiologia Celular e laboratório de Comunicação Neuronal que sempre me acolheram, sempre estiveram dispostos a me ajudar e tornam meus dias de trabalho mais felizes.

À órgãos de fomento CAPES, FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro.

Por fim, à Deus por me proteger, abençoar e por permitir que eu tenha ao meu lado essas pessoas que fazem de mim uma pessoa melhor e feliz.

OBRIGADA!

*“Todos os nossos sonhos podem vir a ser
verdadeiros se tivermos a coragem de
perseguí-los”*

Walt Disney

RESUMO

GARCIA, P.C. **O impacto do exercício físico a curto e a longo prazo na evolução da doença de Parkinson em ratos.** 2016. 77 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN) é típica na doença de Parkinson (DP) e esta é responsável pela hiperexcitabilidade dos neurônios espinais médios resultante de uma neurotransmissão glutamatérgica corticoestriatal anormal, que pode provocar dentre outros danos, déficits motores característicos da doença. Considerando os efeitos neuroprotetores promovidos pelo exercício físico, o objetivo deste estudo foi observar o impacto do exercício realizado a curto e a longo prazo durante a evolução da lesão por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos. Para isso, foram utilizados ratos Wistar, divididos em grupos sedentário/exercitado, com/sem lesão por 6-OHDA, acompanhados por um período máximo de 4 meses. Animais dos grupos exercitados foram submetidos ao exercício em esteira de intensidade moderada, 3xsemana. Foram mensurados por imuno-histoquímica e *immunoblotting* as proteínas tirosina hidroxilase (TH), proteína do citoesqueleto regulada por atividade (Arc), receptores glutamatérgicos tipo AMPA GluA1 e GluA2/3, proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP2), neurofilamentos e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) nas regiões da SN, estriado (CPu) e córtex motor (CxM). Nossos resultados mostraram maior redução da expressão de TH em todos os grupos sedentários em comparação aos grupos exercitados, indiferentemente do tempo de treinamento. Entre as proteínas estruturais (MAP2 e neurofilamentos) observamos um aumento crescente de MAP2 no CPu, que evolui desde o primeiro até o último mês de treinamento, e ocorre apenas nos animais exercitados. Já na SN, essa diferença entre grupos ocorreu apenas no último mês no grupo treinado. Porém, quando se observou apenas as ramificações dopaminérgicas na SN, notou-se que a maior diferença entre grupos está no grupo treinado por 1 mês, que mostrou menor perda da arborização quando comparado aos animais sedentários. Para os receptores AMPA, e Arc, em geral, as maiores alterações ocorreram no CPu, no primeiro e terceiro mês de exercício. Enquanto após 1 mês de exercício, há aumento de expressão de GluA2/3, a expressão de GluA1 e Arc parecem reduzidas, e após 3 meses de treinamento essa relação se inverte, mostrando redução da expressão de GluA2/3 e aumento de Arc nos animais exercitados. Essa relação não foi evidenciada nos animais sedentários. Resultados similares foram visualizados no CxM dos animais exercitados. Por último, a resposta do BDNF frente ao exercício foi observada com aumento da expressão principalmente no primeiro mês de treinamento. No segundo mês de treinamento ocorreu uma redução da expressão, que volta a aumentar mais acentuadamente no quarto mês de treinamento.

Essas modificações podem ser relevantes para o circuito corticoestriatal, uma vez que a plasticidade dependente do exercício é capaz de modular a excitabilidade neuronal, reduzindo a hiperexcitabilidade glutamatérgica encontrada na DP. Além disso, nossos resultados conseguem deixar claro que diferentes tempos de exercício físico podem orquestrar alterações nos níveis de

expressão de proteínas promovendo um balanço homeostático, e assim modular a hiperexcitabilidade cortical. De forma geral, estes resultados suportam os potenciais efeitos do exercício físico em alterar a conectividade sináptica dos circuitos corticoestriatal e nigroestriatal em uma situação de depleção dopaminérgica, e assim, possivelmente modificar a progressão da doença em indivíduos com DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. 6-OHDA. Exercício físico. Receptores glutamatérgicos AMPA. Arc.

ABSTRACT

GARCIA, P.C. **The impact of short and long-term exercise during evolution of the Parkinson's disease in rats.** 2016. 77 p. Ph.D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The loss of nigral dopaminergic neurons characteristic of Parkinson's disease (PD) is responsible for hyperexcitability of medium spinal neurons resulting in abnormal corticostriatal glutamatergic neurotransmission, which can cause, among other alterations, motor deficits typical of that disease. Considering the neuroprotective effects of exercise, the aim of this study was to observe the impact of short and long-term exercise during evolution of the 6-hydroxydopamine (6-OHDA) animal model of PD. Wistar rats were divided into sedentary and exercised groups, with and without lesion by 6-OHDA and followed up to 4 months. The exercise groups were subjected to a moderate treadmill exercise protocol 3 times a week. We measured the proteins tyrosine hydroxylase (TH), activity-regulated cytoskeleton-associated protein (ARC), glutamatergic receptors AMPA type GluA1 and GluA2/3, microtubule-associated protein 2 (MAP2), neurofilaments and brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the substantia nigra (SN), striatum and motor cortex (CxM) by immunohistochemistry and *immunoblotting*. Our results showed a higher reduction of TH expression in all sedentary groups when compared to all exercised groups, in striatum and SN, independent of protocol duration. For the structural proteins (MAP2 and neurofilaments), we observed an increase of MAP2 expression in striatum, which occurs from the first to the fourth month of training only in the exercised animal groups. In the SN, the difference between groups occurred only in the last month in the exercised groups. However, when analyzed only the dopaminergic dendritic branches in SN, we found that the higher difference between groups occurred in the exercised group for one month, showing less loss of branches when compared to sedentary animals. For AMPA receptors and Arc, in general, larger changes occurred in the striatum in the first and third month after training. While after one month of exercise there was a significant increase of GluA2/3, the GluA1 and Arc expression was reduced, and after 3 months of training this relationship was reversed, showing reduced expression of GluA2/3 and increase of Arc in exercised animals. This relationship is evidenced in the sedentary animals. Similar results were observed in the CxM of the exercised animals. Finally, the response of BDNF to exercise was observed with increase of expression especially in the first month of training. In the second month of training there was a reduction in the expression, that returns to an increase in the last month of training. These modifications may be relevant for corticostriatal circuits, since the exercise-dependent plasticity can modulate neuronal excitability by reducing glutamatergic hyperexcitability found in PD. In addition, our results showed that different times of exercise can generate changes in protein expression possibly promoting a homeostatic balance, and thus modulating cortical hyperexcitability. Overall, these results reinforce the potential effects of exercise to change synaptic connectivity of corticostriatal and nigrostriatal circuits in a dopaminergic depletion state, and to possibly modify the progression of the disease in patients with PD.

Keywords: Parkinson's disease. 6-OHDA. Physical Exercise. AMPA glutamatergic receptors. Arc.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1 - Conexões dos núcleos da base: via direta e indireta.	19
Figura 2 - Esquema ilustrativo do CPu de encéfalo de ratos.....	35
Figura 3 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de Tirosina Hidroxilase no CPu e SN.	44
Figura 4 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de GluA1 no CPu e CxM.	47
Figura 5 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de GluA2/3 no CPu e CxM.	48
Figura 6 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de Arc no CPu e CxM.	51
Figura 7 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de BDNF CPu e SN.	53
Figura 8 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão dos neurofilamentos no CPu.	55
Figura 9 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de MAP2 no CPu.....	58
Figura 10 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de MAP2 e ramificações dopaminérgicas na SN.	59

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-OHDA – 6-hidroxi-dopamina

AMPA – α -amino-3-hydroxil-5-metil-4-isoxazolpropiónico

Arc – Proteína do citoesqueleto regulada por atividade

BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo

CPu – Caudado e Putâmen (estriado)

CxM – Córtex motor

DA – Dopamina

DP – Doença de Parkinson

EROS – Espécies reativas de oxigênio

GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia

GluA1 – Subunidade 1 do receptor de glutamato tipo AMPA

GluA2/3 – Subunidade 2/3 do receptor de glutamato tipo AMPA

GPe – Globo pálido externo

GPi – Globo pálido interno

Grupo 6-OHDA – Grupo de animais sedentários

Grupo 6-OHDA+Ex – Grupo de animais exercitados

K252a – Inibidor do receptor de BDNF. TrKb

LPS – Lipopolissacarídeo

MAP2 – Proteína associada ao microtúbulo 2

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina

MSN – Neurônios espinais médios

SN – Substância negra

SNc – Substância negra parte compacta

SNr - Substância negra parte reticular

STN – Núcleo subtalâmico

TH – Tirosina hidroxilase

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Doença de Parkinson	16
1.2	Núcleos da Base	18
1.3	Agentes Neurotóxicos	20
1.3.1	6-OHDA.....	20
1.4	Exercício Físico	22
1.5	Plasticidade Sináptica	25
1.5.1	<i>Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo – BDNF.....</i>	<i>25</i>
1.5.2	<i>Proteínas Estruturais: proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP2) e Neurofilamentos</i>	<i>26</i>
1.5.3	<i>Proteína do citoesqueleto regulada por atividade - Arc.....</i>	<i>28</i>
1.5.4	<i>Receptores Glutamatérgicos tipo AMPA</i>	<i>29</i>
1.6	Justificativa.....	32
1.7	Objetivo Geral	33
1.7.1	Objetivos Específicos	33
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1	Animais.....	34
2.2	Administração de 6-OHDA	34
2.3	Protocolo de Exercício	35
2.4	Protocolo de Imuno-histoquímica	36
2.5	Protocolo de immunoblotting.....	37
2.6	Análise Estatística	37
3	RESULTADOS	39
3.1	Neuroproteção promovida pelo exercício físico sobre os neurônios dopaminérgicos	42
3.2	Exercício em diferentes tempos promove oscilações nos níveis de expressão dos receptores glutamatérgicos GluA1 e GluA2/3 no modelo da Doença de Parkinson	45
3.3	Diferentes tempos de treinamento físico promovem alterações sincronizadas da expressão de Arc após indução da DP	49
3.4	A maior alteração da expressão de BDNF ocorre após 1 mês de exposição ao exercício físico.....	52
3.5	Redução da expressão de neurofilamentos 4 meses após a indução da DP em ratos não treinados.....	54
3.6	Análise de arborização dendrítica após a indução do modelo da DP e o protocolo de treinamento físico	56

4	DISCUSSÃO	60
4.1	Fatores neurotróficos	62
4.2	Proteínas estruturais	63
4.3	Sistema glutamatérgico	65
5	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS*	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) e seus distúrbios foram descritos pela primeira vez em 1817, por James Parkinson (PARKINSON, 2002) e essa atualmente é a doença crônica neurodegenerativa mais prevalente após a Doença de Alzheimer (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008). A DP é uma doença neurodegenerativa, progressiva, caracterizada histologicamente pela diminuição de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo, especialmente na substância negra parte compacta (SNc), resultando em uma diminuição da produção de dopamina (DA) e consequente perda dopaminérgica estriatal (BURCH; SHEERIN, 2005; STOTT; BARKER, 2014; WIRDEFELDT et al., 2011). Outra característica histológica da DP é o acúmulo de proteínas insolúveis como a alfa-sinucleína em inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy) nos neurônios dopaminérgicos da SNc e, em alguns casos, em neurônios não-dopaminérgicos (BLANDINI; ARMENTERO, 2012). Devido o envolvimento da DA na modulação dos movimentos voluntários, a DP é clinicamente caracterizada pelos sintomas motores: bradicinesia/acinesia, tremor de repouso, rigidez muscular e instabilidade postural (AIRAVAARA et al., 2012; BURCH; SHEERIN, 2005). Além dos sintomas motores, um outro fator importante envolvido na DP é a presença de alterações cognitivas. O quadro demencial na DP geralmente instala-se em fases mais tardias da evolução da doença e tem como principais características a lentidão de pensamentos, apatia, comprometimento da memória e depressão (AARSLAND et al., 2003). Um estudo longitudinal mostrando a relação de demência e DP demonstrou registrou uma alta prevalência do desenvolvimento da demência na DP, acometendo 78% de uma base populacional e representativa de pacientes com a doença (AARSLAND et al., 2003). A presença da demência na DP está entre os preditores do aumento da taxa de mortalidade, que inclui também a gravidade da doença (medida pela escala de Hoehn e Yarh) e o acometimento da doença com idade precoce (WIRDEFELDT et al., 2011).

A etiologia da DP ainda não é bem esclarecida, porém estudos epidemiológicos indicam alguns fatores que podem contribuir para o

desenvolvimento da doença. Entre esses fatores, está a exposição a pesticidas, herbicidas, produtos químicos industriais, além de alguns metais, solventes orgânicos e monóxido de carbono (OLANOW; TATTON, 1999; WIRDEFELDT et al., 2011). Além disso, estudos mostram que fatores genéticos podem estar envolvidos na etiologia. Aproximadamente 5-10% dos pacientes com DP têm uma forma familiar de parkinsonismo com um padrão autossômico dominante de herança (GOLBE, 1990). Além desses fatores que podem contribuir para a patogênese da doença, há alguns processos subjacentes à degeneração dos neurônios dopaminérgicos que ocorrem na DP, tais como, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, toxicidade por glutamato e apoptose (BLANDINI et al., 2000; BLUM et al., 2001). A disfunção na fosforilação oxidativa tem um papel importante na patogênese da DP. Essa disfunção ocorre por anormalidades na atividade do complexo I da mitocôndria, que expõe as células ao estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), provocando danos e/ou morte celular. Vários marcadores biológicos de danos oxidativos estão elevados no encéfalo de pacientes parkinsonianos *post mortem*. Além disso, consistente com o aumento de EROs, o nível de glutathione (antioxidante) está reduzida nos cérebros desses pacientes (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Apesar da existência de morte dos neurônios dopaminérgicos, estudos mostram que a eficiência dopaminérgica é mantida, principalmente durante o período que antecede os primeiros sintomas clínicos da DP. O aparecimento dos primeiros sintomas motores característicos da doença ocorre quando há perda de aproximadamente 30% dos neurônios dopaminérgicos da SNc junto a um déficit de aproximadamente 80% do nível de dopamina estriatal (BEZARD; GROSS, 1998; NANDHAGOPAL et al., 2011). Esse retardo do aparecimento dos sintomas motores ocorrem devido a existência de mecanismos compensatórios que são capazes de mascarar essa perda dopaminérgica. Vários fatores estão envolvidos nesses mecanismos de compensação, entre eles está o processo de plasticidade neuronal, aumento da síntese e da atividade dopaminérgica, a transferência da função dopaminérgica para outros sistemas não dopaminérgicos, entre outros (BEZARD; GROSS, 1998; CALNE; ZIGMOND, 1991; ZIGMOND et al., 1990).

1.2 Núcleos da Base

A SN é uma das estruturas que compõem os núcleos da base (NB) que são responsáveis pela maioria dos programas motores de rotina, além de participarem da formação de memória e aprendizado (CALNE; ZIGMOND, 1991). A SN é dividida em duas partes, a parte reticular (SNr) composta principalmente por neurônios GABAérgicos e a parte compacta (SNc) que contem neuromelanina e neurônios dopaminérgicos. A SNc é responsável pelas principais conexões eferentes desta estrutura (ALEXI et al., 2000). A SN tem importantes funções dentro do circuito dos NB, com maior participação através de grandes projeções recíprocas com seu tecido alvo, o estriado (CPu) (SMITH et al., 1998).

As conexões dos NB são baseadas em duas vias estriado-palidais distintas. Uma via direta formada por neurônios espinais médios (MSN) contendo receptores dopaminérgicos do tipo D1 que envia seus axônios para os núcleos de saída GABAérgicos dos núcleos da base, para o globo pálido interno (GPi) e dele para os núcleos motores do tálamo. E a via indireta formada por MSNs contendo receptores dopaminérgicos do tipo D2 que envia seus axônios para o globo pálido externo (GPe), projeta para os neurônios glutamatérgicos do núcleo subtalâmico (STN), e envia seus axônios para os núcleos de saída dos NB, GPi e tálamo, onde formam sinapses excitatórias nos neurônios de saída inibitórios (KREITZER; MALENKA, 2008) (Figura 1). A ativação da via direta desinibe o tálamo, aumentando a atividade talamocortical, enquanto que a ativação da via indireta inibe os neurônios talamocorticais. Assim, a via direta facilita o movimento e a via indireta inibe o movimento. Ao agir sobre os receptores D1 ou D2, a DA atua como um neuromodulador, modulando de forma diferente a atividade da via direta e da via indireta, porém a resposta final será a mesma, reduzindo a inibição dos neurônios talamocorticais e facilitando os movimentos iniciados pelo comando do córtex motor, através do controle da excitabilidade dos MSNs no CPu, regulando a plasticidade sináptica em diferentes entradas glutamatérgicas (DELONG, 2003; GARDONI; BELLONE, 2015).

Na DP, com a morte dos neurônios dopaminérgicos da SNc, há um déficit de DA nesse sistema provocando então uma redução da ativação da via direta e

hiperatividade da via indireta. Assim, como consequência da depleção dopaminérgica, os sintomas motores característicos da DP são evidenciados (Figura 1). Além disso, estudos mostram uma assimetria do efeito da depleção de DA sobre os MSNs estriatopalidais e estriatonigrais, onde há uma intensa diminuição de espinhos dendríticos e sinapses glutamatérgicas nos MSNs estriatopalidais mas não nos MSNs estriatonigrais (DAY et al., 2006).

Figura 1 - Conexões dos núcleos da base: via direta e indireta.

A caixa amarela indica as interligações dos núcleos da base que recebem as conexões extrínsecas das regiões corticais e tálamo. Para simplificar, algumas conexões foram omitidas neste diagrama. O painel esquerdo indica os circuitos no estado "normal" e o da direita mostra as mudanças globais nas atividades associadas à doença de Parkinson. Setas azuis e vermelhas indicam conexões inibitórias e excitatórias, respectivamente. A espessura das setas corresponde à atividade exacerbada ou comprometida das conexões.

Abreviações: D1 e D2: receptores dopaminérgicos do tipo 1 e 2, respectivamente; GPe: globo pálido externo; STN: núcleo subtalâmico; GPi: globo pálido interno; SNr: substância negra parte reticular; VA: núcleo subtalâmico ventral anterior; VL: núcleo subtalâmico ventrolateral; CM: núcleo talâmico centromedial; PF: núcleo talâmico parafascicular.

Fonte: modificado de Galvan; Devergnas; Wichamann, 2015

1.3 Agentes Neurotóxicos

O desenvolvimento de modelos animais de DP é essencial para uma melhor compreensão da patogênese e progressão da DP, além de testar agentes terapêuticos para o tratamento da doença. Assim, os modelos de toxinas têm o objetivo de reproduzir as alterações patológicas e comportamentais da doença humana em roedores ou primatas, onde após a administração sistêmica ou local (intracerebral) essas neurotoxinas são capazes de induzir a degeneração do sistema nigroestriatal. Entre as neurotoxinas mais utilizadas estão aquelas que afetam ou destroem seletivamente o sistema catecolaminérgico, tais como 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) e lipopolissacarídeo (LPS) (BLESA et al., 2012; JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012; SACHS; JONSSON, 1975). Além disso, produtos químicos agrícolas, tais como. rotenona, manebe e paraquat, quando administrados sistemicamente, podem também induzir características específicas da DP (BETARBET; SHERER; GREENAMYRE, 2002; SCHOBBER, 2004). Uma característica comum de todos os modelos que são induzidos por neurotoxina é que todos eles afetam as mitocôndrias, quer por inibição do complexo I ou do complexo III mitocondrial, alterando a cadeia respiratória (BLESA et al., 2012; SCHOBBER, 2004).

1.3.1 6-OHDA

A neurotoxina 6-OHDA é estruturalmente semelhante à DA e norepinefrina e tem uma elevada afinidade com o transportador dopaminérgico permitindo a entrada da toxina nos neurônios dopaminérgicos (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008). Uma vez dentro dos neurônios, a 6-OHDA se acumula no citosol e é facilmente oxidada, provocando a formação de radicais livres, principalmente de peróxido de hidrogênio e paraquinona (altamente tóxicos à célula) (BLANDINI; ARMENTERO, 2012). Como um mecanismo adicional a 6-OHDA pode se acumular nas mitocôndrias, inibindo a atividade da cadeia de transporte de elétrons, bloqueando o complexo I (BLANDINI et al., 2008). A 6-OHDA não atravessa a barreira hemato-encefálica e deve ser injetada diretamente no cérebro. É administrada geralmente de forma unilateral na SN, no feixe prosencefálico medial ou no CPu. A injeção

intraestriatal de 6-OHDA induz rapidamente danos nos terminais dopaminérgicos estriatais seguido de danos progressivos nos neurônios dopaminérgicos da SNc, que são afetados através de um mecanismo retrógrado. O grau de perda de neurônios DA e dos seus terminais no estriado dependem da localização da injeção, da dose da toxina, assim como do tempo após a lesão que a análise é feita (BLANDINI; ARMENTERO, 2012). Sabe-se que altas doses de 6-OHDA administradas no CPu são capazes de provocar lesões nos terminais dopaminérgicos, expressas pela redução da imunorreatividade de tirosina hidroxilase (TH), e lentamente, ao longo de semanas, destrói os neurônios da SN, atingindo o máximo de morte neuronal 3 semanas pós lesão (SCHOBER, 2004). O modelo de 6-OHDA não reproduz todos os aspectos patológicos e clínicos de parkinsonismo humano, por exemplo, neste modelo, não há formação de inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy). Além disso, são raros os relatos dos tremores característicos da doença provocados pela neurotoxina, porém outros sintomas como acinesia e rigidez são geralmente relatados (SCHOBER, 2004).

Vários estudos utilizam testes motores alguns dias após a administração de 6-OHDA para mensurar a magnitude da perda nigroestriatal (REAL et al., 2013; TAJIRI et al., 2010; TUON et al., 2012). Para realização destes testes são injetadas doses de apomorfina (agonista dopaminérgico) ou anfetamina (inibidor da captação de DA) nos animais e é contado o número de rotações que o animal realiza. Observa-se rotações ipsolaterais ao hemisfério lesado quando a anfetamina é administrada e rotações contralaterais quando a apomorfina é injetada. Esses testes somente são possíveis quando a lesão por 6-OHDA é realizada de forma unilateral, evidenciando assim a assimetria motora dos animais (BLANDINI; ARMENTERO, 2012).

1.4 Exercício Físico

Neuroplasticidade refere-se à capacidade do sistema nervoso de mudar, adaptar-se e moldar-se a nível estrutural e funcional ao longo do desenvolvimento neuronal e quando exposto a mudanças no comportamento ou no ambiente (MORA; SEGOVIA; DEL ARCO, 2007). Esta capacidade de modificar redes neurais existentes por adição ou modificação de sinapses ocorre na base da formação de memórias e da aprendizagem bem como na adaptação a lesões e eventos traumáticos ao longo da vida adulta (PETZINGER et al., 2013). A literatura tem mostrado vários mecanismos pelos quais o exercício físico pode facilitar a neuroplasticidade. Dentre esses está a capacidade de promover neurogênese (VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999), angiogênese (AL-JARRAH et al., 2010; KLEIM; COOPER; VANDENBERG, 2002), alterações na expressão de fatores neurotróficos endógenos (KLINTSOVA et al., 2004; REAL et al., 2013; TUON et al., 2012), de neurotransmissores e receptores (KINTZ et al., 2013; REAL et al., 2010), e em proteínas sinápticas e estruturais (FERREIRA et al., 2010; GARCIA et al., 2012; REAL et al., 2015). Além disso, as adaptações que o exercício causa no sistema nervoso também têm implicações na prevenção de distúrbios neurológicos, tais como, a DP (ALONSO-FRECH; SANAHUJA; RODRIGUEZ, 2011; Xu et al., 2010), doença de Alzheimer (ARCHER, 2011; PEREZ; CANCELA CARRAL, 2008; RADAK et al., 2010), acidente vascular isquêmico (GRIESBACH; HOVDA; GOMEZ-PINILLA, 2009) e lesões medulares (YING et al., 2005). Vários estudos mostram uma relação inversa entre a DP e a prática de exercício físico (ALONSO-FRECH; SANAHUJA; RODRIGUEZ, 2011) (40% menor risco quando comparado a pessoas inativas), sendo que o efeito protetor promovido parece ser maior quando este é praticado ainda na fase adulto-jovem (aproximadamente 35 anos) (XU et al., 2010). Estudos clínicos mostraram que a realização de exercício físico na fase inicial da DP em humanos resulta em melhor desempenho na realização de atividades de vida diária, melhora na qualidade de vida, força, equilíbrio, melhor desempenho locomotor e independência funcional (MIYAI et al., 2000; SUNVISSON et al., 1997).

Para elucidar os mecanismos subjacentes da melhora funcional em humanos com DP promovida pelo exercício físico muitos estudos têm utilizado os modelos

de DP em animais e desenvolvendo diversos protocolos de exercício. Esses protocolos diversos incluem diferentes modalidades de exercício com frequências e intensidades distintas. Porém, independentemente do tipo de exercício físico, estes são capazes de promover melhoras no aprendizado, memória e plasticidade (ARIDA et al., 2011).

Em ratos induzidos à DP por 6-OHDA, MPTP e LPS, a utilização de exercício voluntário e/ou exercício forçado realizado em esteira mostra que essas manobras são capazes de atenuar a perda de DA no CPu e de neurônios dopaminérgicos na SNc (REAL et al., 2013; TAJIRI et al., 2010; TUON et al., 2012; WU et al., 2011) e promover ou não alterações significativas nos déficits comportamentais (REAL et al., 2013; TILLERSON et al., 2003; TUON et al., 2012). Além disso, há estudos mostrando que o exercício é capaz de aumentar marcadores de neurogênese (bromodeoxyuridine - BrdU e doublecortin - DCX) na área estriatal subventricular, demonstrando aumento na proliferação e migração neural de células progenitoras (TAJIRI et al., 2010). Uma das formas pelos quais o exercício é capaz de proteger os neurônios dopaminérgicos contra o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e outros processos inflamatórios e apoptóticos é através da regulação de fatores neurotróficos. Vários estudos têm relatado a capacidade do exercício em aumentar os níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (AL-JARRAH et al., 2010; LAU et al., 2011; REAL et al., 2013; TAJIRI et al., 2010). Animais modelos de DP expostos a diferentes protocolos de exercício (3 vezes por semana durante 4 semanas; 3 vezes por semana durante 8 semanas; 5 vezes por semana durante 4 semanas) mostraram aumento nos níveis de BDNF no CPu. Para reforçar a idéia da participação do BDNF na neuroproteção dopaminérgica na DP um estudo mostrou que quando há bloqueio dos receptores de BDNF (Trkb) em modelo animal por 6-OHDA, os efeitos benéficos promovidos pelo exercício ao sistema dopaminérgico são inibidos (REAL et al., 2013).

Além da regulação de fatores neurotróficos, há um mecanismo pelo qual o exercício pode conduzir a neuroplasticidade dependente da experiência na DP, promovendo melhora comportamental. Esse mecanismo ocorre através da redução da hiperatividade corticoestriatal mediada pelos receptores

glutamatérgicos tipo α -amino-3-hydroxil-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). Estudos mostraram que a melhora no desempenho motor de ratos induzidos a DP por MPTP está relacionado ao aumento nos níveis de GluA2 (subunidade dos receptores AMPA) no CPu que ocorre apenas em animais submetidos a exercício físico (VANLEEUEWEN et al., 2010). Além disso, quando o exercício não é realizado (sedentários) pelos animais submetidos ao modelo da DP, há um aumento na amplitude de correntes excitatórias pós-sinápticas, o que caracteriza a hiperatividade glutamatérgica. O mesmo não é observado nos animais treinados. A alteração nos níveis de receptores AMPA (GluA2) e da sua fosforilação na serina 880 promovida pelo exercício pode conduzir a uma internalização do receptor levando a diminuição da força sináptica (depressão a longo prazo) atenuando assim a hiperativação do circuito corticoestriatal (PETZINGER et al., 2010; VANLEEUEWEN et al., 2010).

São inúmeros os estudos que mostram que o exercício físico leva a melhora no desempenho motor em modelos animais de DP. Independentemente do tipo de exercício, esteira ou voluntário (roda), ou então o tempo total da realização do exercício, curto ou longo prazo, ou ainda, se o exercício é realizado apenas antes da cirurgia de indução da doença, somente depois da cirurgia, antes ou depois da cirurgia, todos esses estudos revelam que o exercício promove uma redução da assimetria rotacional causada pela depleção dopaminérgica (testes rotacionais realizados com a administração de apomorfina ou anfetamina) (MABANDLA et al., 2004; REAL et al., 2013; TUON et al., 2012; YOON et al., 2007). Além do teste rotacional, outros testes comportamentais são realizados a fim de observar as respostas promovidas pelo exercício, como o teste do campo aberto e o teste no aparelho RotaRod® (PETZINGER et al., 2007; REAL et al., 2013); os resultados mostram que os efeitos benéficos do exercício evidenciados nas técnicas celulares acompanham o benefício funcional evidenciado nesses testes de desempenho motor.

1.5 Plasticidade Sináptica

1.5.1 Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo – BDNF

Os fatores neurotróficos (FNs) fazem parte de uma família de proteínas que funcionam como fatores de crescimento necessários para a manutenção, sobrevivência e maturação de populações neuronais distintas (DOMANSKYI; SAARMA; AIRAVAARA, 2015; HEGARTY; O'KEEFFE; SULLIVAN, 2014; SIEGEL; CHAUHAN, 2000). Além de estarem envolvidos na proliferação, ramificação de neuritos e no crescimento celular, os FNs também são importantes para a modificação de disfunções neuronais, ativação astrocitária e reações inflamatórias em condições patológicas. Muitos estudos vêm mostrando evidências de que os FNs sob determinadas condições, também podem modular a plasticidade neuronal através da ligação e ativação de seus receptores cognatos (DOMANSKYI et al., 2015; LI; KEIFER, 2009; SIEGEL; CHAUHAN, 2000). Várias proteínas são classificadas como FNs, tais como o BDNF, GDNF, fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) e VEGF (SIEGEL; CHAUHAN, 2000).

O BDNF é um fator neurotrófico que desempenha um papel central na maturação neuronal, na formação de circuitos, e na plasticidade dependente de atividade, tais como a potenciação a longo prazo (LTP). Além disso, no sistema nervoso adulto, o BDNF endógeno é capaz de instruir a expressão de genes e a síntese de proteínas subjacentes à LTP e à formação da memória (KUIPERS et al., 2016; PARK; POO, 2013). Devido a estas importantes propriedades do BDNF vários estudos mostram interesse em observar a expressão deste fator em doenças neurodegenerativas tais como a doença de Alzheimer, DP e doença de Huntington. Estudos mostram que há redução do nível de expressão de BDNF na SNc e no estriado de pacientes com DP. Embora essa redução seja esperada devido a depleção de neurônios dopaminérgicos característica da doença, aqueles neurônios dopaminérgicos remanescentes ainda expressam menos BDNF quando comparados ao grupo controle (HOWELLS et al., 2000). O BDNF parece estar envolvido com a sobrevivência e manutenção dos neurônios dopaminérgicos devido sua afinidade específica para os receptores de tirosina-quinase (particularmente com o receptor TrkB). A ativação do receptor de

tirosina-quinase é responsável pela ativação da CREB. CREB é um fator de transcrição celular que se liga a uma sequência de DNA específica conhecida como um elemento de resposta a AMP cíclico (AMPC), podendo regular a transcrição do gene TH (DA SILVA et al., 2016). Vários estudos mostram que o exercício físico é capaz de promover aumento nos níveis de expressão de BDNF (REAL et al., 2013; TUON et al., 2012; WU et al., 2011) e a neuroplasticidade induzida pelo exercício pode ocorrer através do aumento da atividade enzimática de TH que modula a síntese de dopamina pelos neurônios dopaminérgicos (COTMAN; BERCHTOLD, 2002; DA SILVA et al., 2016). Em adição, esse efeito neuroprotetor promovido pelo exercício é dependente de BDNF. Isso foi observado no estudo do nosso grupo, que ao expor animais submetidos ao modelo da DP por 6-OHDA ao exercício físico em esteira por 1 mês observou um efeito neuroprotetor, ou seja, menor perda de neurônios dopaminérgicos quando comparados aos animais sedentários. Porém, quando o receptor TrkB foi bloqueado (através da injeção no estriado de K252a juntamente com a indução do modelo da DP), esta neuroproteção não ocorreu (REAL et al., 2013). Resultados semelhantes foram observados por Wu e colaboradores, que mesmo usando um outro modelo de DP (LPS) e outro protocolo de exercício físico mostrou que a proteção induzida pelo exercício atenuando a perda dopaminérgica não ocorreu quando foi utilizado um antagonista do receptor TrkB, bloqueando a ação do BDNF (WU et al., 2011). Esses resultados em conjunto sugere que a neuroproteção que o exercício pode promover frente a DP ocorre através da via de sinalização BDNF-TrkB.

1.5.2 Proteínas Estruturais: proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP2) e neurofilamentos

O citoesqueleto neuronal é uma complexa rede de proteínas, altamente dinâmica, que participa dos processos de plasticidade, transporte e sinalização celular, além de ser o principal determinante da morfologia celular (PERROT et al., 2008). É composto por três estruturas interligadas – microfilamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários. Os neurofilamentos são filamentos intermediários neurônio-específicos que representam um dos principais componentes do citoesqueleto, encontrados em maior proporção em axônios mielinizados (GOTOW, 2000; LIU et al., 2011; SZARO; STRONG, 2010). Os neurofilamentos são conhecidos por serem estruturas altamente

dinâmicas, cuja principal função é o controle do calibre axonal. Uma vez que a velocidade da condução de um impulso é em parte, proporcional ao calibre do axônio, torna o papel dos neurofilamentos de grande importância (AL-CHALABI; MILLER, 2003; PERROT et al., 2008; SZARO; STRONG, 2010). Além disso, os neurofilamentos também contribuem na diferenciação neuronal, crescimento, regeneração e orientação axonal (PERROT et al., 2008). Análises de amostras de SN de pacientes com DP apresentam redução dos níveis de neurofilamentos, bem como do seu RNAmensageiro, estando estes correlacionados com a gravidade da doença (BASSO et al., 2004; HILL et al., 1993).

Os microtúbulos são estruturas constituídas por moléculas de tubulina e uma série de outras proteínas associadas (MAPs), que fazem parte do citoesqueleto das células neurais. A proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP2) é uma das MAP's mais abundantes no encéfalo, predominantemente expressa nos dendritos (SANCHEZ; DIAZ-NIDO; AVILA, 2000; TUCKER; GARNER; MATUS, 1989). Podem desempenhar múltiplas funções, tais como, a estabilização de microtúbulos e possíveis microfilamentos, regulação da extensão dos neuritos, transporte de organelas dentro de axônios e dendritos, fixação de proteínas reguladoras como proteínas quinases, entre outras. A MAP2 é considerada um marcador da integridade estrutural, além de estar envolvida na estabilização morfológica dos processos dendríticos, no remodelamento e crescimento da arborização dendrítica, desempenhando um papel no processo de plasticidade neuronal (DERKSEN et al., 2007; GONZALEZ-BILLAULT et al., 2002; MANDELKOW; MANDELKOW, 1995).

Estudos mostram que proteínas do citoesqueleto, como MAP2, neurofilamentos e Tau, quando estão alteradas morfológicamente, podem estar relacionadas com a morte neuronal presente em diversas doenças neurodegenerativas (D'ANDREA; ILYIN; PLATA-SALAMAN, 2001; MELROSE et al., 2010; MURAMATSU et al., 2003). Na DP foi observado, além de alterações na morfologia, alterações na distribuição de MAP2. Essas alterações podem provocar um transporte neuronal deficiente o que contribui para a progressão da perda neuronal em pacientes com DP (D'ANDREA et al., 2001).

1.5.3 Proteína do citoesqueleto regulada por atividade - Arc

Vários são os mecanismos que controlam as alterações plásticas que ocorrem no sistema nervoso central. A expressão de “genes precoces imediatos” (IEG’s) tem sido postulada com um dos mecanismos que controlam essas alterações que são guiadas por reestruturação morfológica, sinaptogênese e “força” sináptica” (PINAUD et al., 2001). Arc é um IEG e a expressão de seu gene é amplamente responsiva à ativação neuronal por mecanismos dopamino-dependentes do CPu (GUZOWSKI et al., 2000), por aprendizagem, pelo BDNF, por LTP e LTD (depressão a longo prazo), além de outros estímulos (KORB; FINKBEINER, 2011). A proteína Arc não é encontrada nos terminais pré-sinápticos ou axônios, mas é muito expressa nos dendritos e núcleos (KORB; FINKBEINER, 2011). Seu RNAmensageiro é distribuído rapidamente em dendritos de áreas com intensa ativação sináptica de forma dependente do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). A proteína é traduzida localmente e, em virtude de sua capacidade de se ligar a actina, podem participar na reconfiguração de sinapses para estabilizar alterações de eficácia sináptica (YIN; EDELMAN; VANDERKLISH, 2002). Estudos mostram que Arc pode estar envolvida com a modificação estrutural da arquitetura sináptica já existente e possivelmente, com a formação de novas sinapses (BAILEY; KANDEL, 1993). Assim, devido a sua localização nos dendritos, autores sugerem uma interação funcional com o citoesqueleto e sabe-se que a atividade sináptica promove remodelação dendrítica e isso é a base estrutural para a plasticidade sináptica (FUJIMOTO et al., 2004). Vários estudos tem mostrado que um aumento da expressão de Arc pode regular a força sináptica principalmente através do aumento da endocitose de receptores tipo AMPA nas regiões pós sinápticas (RIAL VERDE et al., 2006; SHEPHERD et al., 2006; WAUNG et al., 2008). Especificamente, na região do hipocampo, a Arc reduz o número de receptores GluA2/3 (subunidade dos receptores glutamatérgicos tipo AMPA) inseridos na membrana por endocitose, e conseqüentemente ocorre uma diminuição na amplitude das correntes sinápticas mediadas por esses receptores (RIAL VERDE et al., 2006). Esses dados mostram a participação de Arc no papel de regulação da força sináptica, sugerindo uma função homeostática ao sistema.

Ainda são escassos os estudos que mostram relação entre a proteína Arc e o exercício físico e ainda a expressão desta proteína na SN e CPu.

1.5.4 Receptores Glutamatérgicos tipo AMPA

O glutamato é o mais abundante neurotransmissor no sistema nervoso central, e ao ativar seus receptores pode causar potencial influxo de Ca^{2+} no neurônio pós-sináptico (SEGOVIA et al., 2001; WRIGHT; VISSEL, 2012). Os receptores glutamatérgicos (GluRs) podem ser divididos em 2 grandes grupos: receptores glutamatérgicos ionotrópicos (iGluRs) e receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs são subdivididos em 3 grupos: AMPA (GluA), NMDA (GluN) e receptores kainato (KA) (SEGOVIA et al., 2001).

Estruturalmente, os receptores AMPA formam um composto tetramérico de com diferentes combinações de quatro subunidades: GluA1-GluA4 (DINGLELINE et al., 1999; FLEMING; ENGLAND, 2010). Todas as proteínas das subunidades dos receptores AMPA tem um terminal N extracelular, um terminal C intracelular, e quatro domínios hidrofóbicos associados a membrana (M1-4), um dos quais (M2) forma um laço reentrante (ISAAC; ASHBY; MCBAIN, 2007; SEGOVIA et al., 2001). Receptores AMPA são amplamente expressos no sistema nervoso central, tanto em neurônios como em células gliais (BELACHEW; GALLO, 2004; WIDEN; SEEBURG, 1993). A grande maioria dos receptores AMPA no sistema nervoso central existem como heterômeros contendo GluA2, sendo que a maior população de neurônios, as células piramidais, expressam receptores AMPA compostos principalmente de heterotetrâmeros de GluA1 e GluA2 (SANS et al., 2003). Os receptores AMPA podem circular dentro e fora da membrana pós-sináptica, e a regulação do tráfego destes receptores é um fator chave na modulação da força sináptica (FLEMING; ENGLAND, 2010). Estas subunidades apresentam características funcionais que podem variar de acordo com sua constituição e arranjo proteico (TANAKA; OGAWA; ASANUMA, 2006). Funcionalmente, os receptores AMPA podem mediar a grande maioria das transmissões sinápticas excitatórias rápidas, assegurando respostas rápidas para o glutamato. Ao ocorrer a ligação do glutamato ao receptor AMPA, ocorre o influxo de sódio (Na^+) (ocasionalmente de Ca^{2+} também e o efluxo de potássio (K^+). Desta forma, o canal formado pelos

receptores AMPA é o principal condutor de corrente, mesmo que em uma situação de repouso (SOMMER et al., 1990; WRIGHT; VISSEL, 2012). GluA2 é uma subunidade chave na determinação da função dos receptores AMPA em mamíferos, sendo envolvidas na cinética do receptor, na condutância do canal, na permeabilidade ao Ca^{2+} , entre outras propriedades biofísicas (ISAAC et al., 2007). A subunidade GluA2 possui uma forma editada e uma não editada. A forma editada se diferencia por possuir um resíduo de arginina (R) na região M2 no lugar de glutamina (Q). Esta edição Q/R é específica para a subunidade GluA2, e ocorre em mais de 95% do RNAmensageiro transcrito de GluA2 (ISAAC et al., 2007). Essas subunidades editadas de GluA2 são impermeáveis ao Ca^{2+} e exibem uma condutividade relativamente baixa enquanto a forma editada são Ca^{2+} -permeáveis, permitindo maior condutância (BOWIE; MAYER, 1995). Logo, canais AMPA sem a subunidade GluA2 (GluA2-lacking), também apresentam alta permeabilidade ao Ca^{2+} e retificação nos potenciais de membrana despolarizada (KINTZ et al., 2013).

Embora o receptor tipo NMDA seja considerado o principal receptor de glutamato envolvido na plasticidade sináptica e na morte celular mediada por excitotoxicidade por Ca^{2+} , os receptores AMPA permeáveis ao íon Ca^{2+} também podem estar envolvidos na plasticidade sináptica, desempenhando um importante papel para a memória e aprendizagem, e contribuir para morte celular por excitotoxicidade em algumas doenças (WRIGHT; VISSEL, 2012). Alterações na expressão de receptores AMPA têm sido observadas em doenças neurológicas, incluindo a doença de Alzheimer, DP, depressão, entre outras, provocando uma neurotransmissão glutamatérgica anormal (ALT et al., 2006; CHANG; VERBICH; MCKINNEY, 2012; KINTZ et al., 2013). Estudos mostram que as alterações induzidas pelo exercício ocorrem seletivamente nos receptores D2 dos MSNs estriatopalisais. Particularmente, nos animais modelos de DP por MPTP há um aumento da expressão de receptores AMPA sem a subunidade GluA2 (GluA2-lacking), o que leva a um aumento da permeabilidade ao Ca^{2+} , aumentando assim a condutância pelo canal. O exercício físico é capaz de aumentar a expressão de receptores AMPA contendo GluA2 promovendo assim uma relação linear corrente/voltagem nos MSNs que contêm receptores D2 (KINTZ et al., 2013). Além de aumentar a expressão de receptores AMPA

GluA2 positivos, o exercício também é capaz de promover aumento do estado de fosforilação dessa subunidade (serina 880) (VANLEEuwEN et al., 2010). Assim, muitos estudos sugerem que o exercício pode ser um potente mecanismo de mitigação da hiperatividade corticoestriatal que ocorre na DP, podendo reduzir os sintomas motores característicos da DP.

1.6 Justificativa

A DP é uma das doenças neurodegenerativas mais encontradas na população mundial e, embora sua etiologia ainda não esteja muito clara, os sintomas que esta doença pode causar são bem conhecidos e geram grandes incapacidades. Após esclarecimentos da literatura, observamos que os modelos experimentais de DP são úteis para investigar a influência do exercício físico sobre os danos causados pela depleção dopaminérgica. Apesar de vários estudos já descreverem esclarecimentos sobre a ação do exercício nos receptores glutamatérgicos e sobre os fatores neurotróficos, maiores informações podem ser obtidas com o objetivo de compreender como diferentes tempos de treinamento físico podem orquestrar as alterações dos níveis de expressão de proteínas promovendo um balanço homeostático, e assim modular a hiperexcitabilidade cortical encontrada na DP. Desta forma, este estudo poderá ser importante na contribuição de um melhor entendimento sobre a DP e possíveis tratamentos.

1.7 Objetivo Geral

Observar os efeitos do exercício físico durante diferentes tempos de treinamento após a depleção dopaminérgica de animais submetidos ao modelo da DP por injeção intraestriatal de 6-OHDA

1.7.1 Objetivos Específicos

- Observar os efeitos do exercício físico nos diferentes tempos de treinamento sobre a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos em animais submetidos a cirurgia de indução da DP por 6-OHDA. Para isso foi analisada a expressão de Tirosina Hidroxilase (TH), uma enzima limitante da síntese de dopamina, no CPu e SN utilizando as técnicas de imuno-histoquímica e *immunoblotting*.
- Observar como o exercício físico pode conduzir a neuroplasticidade dependente da experiência através da análise de Arc, BDNF, GluA1 e GluA2/3 de animais submetidos a cirurgia de indução da DP e a diferentes tempos de treinamento físico. Além das regiões CPu e SN, o nível de expressão de Arc, GluA1 e GluA2/3 também foi analisada na região do córtex motor (CxM). Para isso foram utilizadas as técnicas de imuno-histoquímica e *immunoblotting*.
- Observar os efeitos do exercício físico sobre as proteínas estruturais MAP2 e neurofilamentos na SNc e CPu em animais submetidos a cirurgia de indução da DP e a diferentes tempos de treinamento físico. Para isso foi utilizado a técnica de imuno-histoquímica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados nos experimentos aproximadamente 230 ratos machos, Wistar, a partir de 3 meses de idade, fornecidos pelo biotério central do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura constante de 23 °C com alimentação e água *ad libitum*, com ciclo claro/escuro invertido artificialmente de 12 / 12 h, 15 dias antes do início do treinamento físico para adaptação ao ciclo invertido e durante todo o treinamento (SALGADO-DELGADO et al., 2008). Os animais foram divididos em grupos, sendo eles: grupo sedentário com injeção de 6-OHDA (6-OHDA), grupo sedentário com injeção de salina (Controle), grupo exercício físico com injeção de 6-OHDA (6-OHDA+Ex) e grupo exercício físico com injeção de salina (Ex), todos esses grupos foram analisados por 1, 2, 3 e 4 meses pós-cirurgia.

Este estudo foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP), protocolo 113 / 12.

2.2 Administração de 6-OHDA

No grupo de animais submetidos ao modelo da DP a dose de 6-OHDA administrada foi de 12 µg / µl, sendo duas injeções de 0,5 µl em duas coordenadas distintas: (1) L: 3 mm; AP: 0,50 mm; V: 4,5 mm; (2) L: 2,5 mm; AP: 1,28 mm; V: 5 mm, no hemisfério direito (Figura 2). Logo, em cada ponto foram injetados 6 µg da droga. A injeção em dois pontos distintos teve o objetivo de garantir que tanto as áreas rostro-caudais, médio-laterais e ventro-dorsais do CPu fossem atingidas pela droga.

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol a 2,5% (1 ml / 100 g – 250 mg / Kg, i.p.) (WAYNFORTH; FLECKNELL, 1992). Com os animais anestesiados foi realizada a fixação destes no aparelho estereotáxico e eles receberam no local da incisão um anestésico local associado a um coagulante para diminuir o sangramento local (lidocaína+epinefrina). Após a craniotomia com auxílio de uma broca de baixa rotação, seguindo coordenadas

estereotáxicas da estrutura-alvo – CPu (PAXINOS; WATSON, 2005), uma micropipeta foi introduzida no encéfalo. Esta foi fixada a um suporte conectado a sistema de pressão (Pico spritzer II – General Valve Corporation) para a infusão da droga 6-OHDA (6-OHDA Hydrochloride-H4381 - Sigma®, Saint Louis, MO, USA) diluída em salina e 0,3% de ácido ascórbico. Depois de terminada a infusão, a micropipeta foi mantida na região infundida por alguns minutos para evitar o refluxo da solução, e então foi lentamente removida. Após finalizada a infusão, a incisão foi suturada e os animais foram mantidos em caixas individuais com bolsas de água quente próximas ao corpo até a recuperação da anestesia.

Figura 2 - Esquema ilustrativo do CPu de encéfalo de ratos.

As áreas destacadas em vermelho representam os locais da administração de 6-OHDA.

Fonte: Adaptado de Paxinos e Watson (2005)

2.3 Protocolo de Exercício

Os animais que foram selecionados para o grupo exercitado foram adaptados à esteira (KT 3000 – IMBRAMED) antes da cirurgia de indução da DP. Esta adaptação ocorreu durante 2 dias, por 15 min, com velocidade inicial de 6,7 m / min com incrementos de 1,7 m / min a cada 5 min. Neste período, os animais que se recusaram a correr foram excluídos deste estudo e utilizados por outros estudos de nosso laboratório. Após a adaptação, os animais foram divididos nos grupos já descritos no item 2.1.

A intensidade do protocolo de exercício estabelecida correspondeu a 50-60% da capacidade máxima de exercício (FELIX; MICHELINI, 2007). O protocolo de treinamento foi realizado no segundo dia pós-operatório, sendo realizado 3

vezes / semana em dias intercalados, por 1, 2, 3 e 4 meses por 40 min. A velocidade inicial foi de 6,7 m / min e foram usados incrementos de 1,7 m / min a cada 1 min. Assim, com 2 min a velocidade era de 10 m / min, velocidade na qual o animal correu pelos 38 min restantes. O horário do início do treinamento foi o mesmo para todos os grupos treinados, acontecendo no período ativo do animal (SALGADO-DELGADO et al., 2008).

2.4 Protocolo de Imuno-histoquímica

Os animais (n=4-6 por grupo) foram anestesiados com ketamina (100 mg / Kg) e xilazina (25 mg / Kg) via intraperitoneal e submetidos à perfusão transcardíaca, com solução salina 0,9%, seguida de solução fixadora de paraformaldeído 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB 0,1 M, pH 7,4). Após a perfusão, os encéfalos foram coletados e pós-fixados por 4-6 horas. Após este período, o encéfalo foi transferido para uma solução crioprotetora de sacarose a 30% em PB 0,1 M. Os tecidos foram cortados em uma espessura de 30 µm em um micrótomo deslizante de congelamento (LEICA SM 2000R). Os cortes histológicos foram coletados em placas de cultivo, em solução crioprotetora, e mantidos em freezer a -20 °C até o momento do procedimento de imuno-histoquímica. Para a imunomarcação nas estruturas SNc, CPu e CxM foi utilizado o protocolo previamente descrito em outros estudos do nosso grupo (GARCIA et al., 2012; REAL et al., 2010). Especificamente para os anticorpos Arc e BDNF, após os cortes serem imersos no meio contendo 3-3'diaminobenzidina (DAB–Sigma-Aldrich), 2 ml de níquel (Sulfato de níquel amoníaco – Fisher Scientific) diluído em água foram adicionados afim de evidenciar a marcação do DAB. Foram utilizadas as diluições de 1:2000 para detecção de TH, feito em camundongo (Millipore), 1:250 para detecção de Arc, feito em coelho (Santa Luiza, CA-USA), 1:250 para detecção de BDNF, feito em coelho, (Millipore), 1:250 para detecção de GluA1, feito em coelho (Chemicon), 1:250 para detecção de GluA2/3, feito em coelho (Chemicon), 1:1000 para detecção de MAP2, feito em camundongo (Chemicon) e 1:1000 para detecção de Neurofilamentos (PAN - anticorpo dirigido contra os neurofilamentos), feito em camundongo (Zymed Laboratories).

A análise qualitativa do material e as quantificações por densitometria foram realizadas com a utilização de microscópio óptico (E1000, Nikon) acoplado a

uma câmera digital, e o programa Image J (NIH, USA), respectivamente. A análise dos receptores glutamatérgicos no CPu e CxM, Arc no CPu, CxM e SNc, BDNF na SNc e CPu e TH na SNc foi realizada por contagem de número de células marcadas para o anticorpo / mm². A análise para as outras proteínas foi realizada através da densitometria óptica relativa.

2.5 Protocolo de *immunoblotting*

Os animais (n=7-9 por grupo) foram decapitados e as regiões do mesencéfalo, CPu e CxM foram rapidamente coletadas em eppendorfs, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o uso. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo previamente descrito nos estudos do nosso grupo (GARCIA et al., 2012; REAL et al., 2010). Quantidade de proteína equivalente a 50 µg foram submetidas a separação por eletroforese com corrente constante de 25 mA em géis de acrilamida de 8% e 12% contendo dodecil sulfato de sódio SDS (Bio-Rad, EUA). Após a separação eletroforética, as membranas foram incubadas com os anticorpos TH – 56-60 kDa (1:1000), Arc – 55 kDa (1:250), BDNF – 32 e 14 kDa (1:250), GluA1 – 99 kDa (1:500) e GluA2/3 – 98 kDa (1:500), além do anticorpo contra β-actina – 42 kDa (1:10.000) utilizada como controle interno da quantidade de proteínas. As membranas foram reveladas utilizando o Kit ECL (BIO-RAD) de quimioluminescência. As bandas foram capturadas pelo escâner de membranas C-DIGIT (Li-Cor, USA) e analisadas quanto à densidade óptica da imunorreatividade utilizando o mesmo programa (C-Digit, USA).

2.6 Análise Estatística

Os dados foram normalizados pelo grupo sedentário salina 1 mês (Controle) e a análise desses dados foi conduzida a partir do teste Three-way ANOVA utilizando o software Statistic 13 (StatSoft, Dell Inc, Texas, USA). Pós teste de Tukey foi utilizado quando necessário. $p \leq 0,05$ foi adotado como nível de significância. Os dados da tabela foram expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Os gráficos foram feitos no software GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, USA). No texto, os resultados foram expressos em porcentagem e na tabela foram expressos a média e SEM. Os grupos foram comparados ao controle, entre grupos (6-OHDA e 6-OHDA+Ex), entre os diferentes tempos do

mesmo grupo (6-OHDA 1 m, 2 m, 3 m e 4 m e 6-OHDA+Ex 1 m, 2 m, 3 m e 4 m) e entre os grupos EX e 6-OHDA+Ex nos quatro tempos de treinamento. O valor de F mostra a significância entre as variáveis: doença de Parkinson, exercício físico e tempo após indução da DP (1, 2, 3 e 4 meses).

3 RESULTADOS

De forma geral, nossos resultados mostraram maiores alterações nos grupos exercitados, sendo adaptativas à depleção dopaminérgica. A seguir nas tabelas, resumimos os dados das comparações entre o grupo controle com os grupos 6-OHDA e 6-OHDA+Ex, as comparações entre os grupos 6-OHDA com os grupos 6-OHDA+Ex e por último, as comparações entre os grupos Ex com os grupos 6-OHDA+Ex (Tabela 1 e 2). Os demais resultados estão descritos a partir dos tópicos 3.1. Os gráficos mostram as diferenças significativas entre os grupos 6-OHDA e 6-OHDA+Ex; entre os grupos 6-OHDA 1 m, 2 m, 3 m e 4 m e entre os grupos 6-OHDA+Ex 1 m, 2 m, 3 m e 4 m.

Tabela 1 – Efeitos dos diferentes tempos de exercício físico no encéfalo de animais após a indução do modelo de DP por 6-OHDA. Análise realizada pela técnica de imuno-histoquímica

Região	Proteína	SED 1 m (Ctl)	6-OHDA 1 m	SED 2 m	6-OHDA 2 m	SED 3 m	6-OHDA 3 m	SED 4 m	6-OHDA 4 m	EX 1 m	6-OHDA+Ex 1 m	EX 2 m	6-OHDA+Ex 2 m	EX 3 m	6-OHDA+Ex 3 m	EX 4 m	6-OHDA+Ex 4 m
Córtex Motor	GluA1	1 (±0,13)	1,38 (±0,07)	1,08 (±0,05)	1,19 (±0,08)	1,3 (±0,09)	1,18 (±0,06)	1,04 (±0,09)	1,2 (±0,07)	1,1 (±0,06)	1 (±0,06)	1,32 (±0,08)	1,08 (±0,14)	1,49 (±0,07)	***/# 1,69 (±0,21)	0,98 (±0,05)	1,13 (±0,03)
	GluA2/3	1 (±0,09)	0,86 (±0,02)	1,08 (±0,04)	1,04 (±0,04)	0,93 (±0,01)	1 (±0,02)	0,84 (±0,02)	0,95 (±0,02)	1,01 (±0,08)	1,01 (±0,08)	1,19 (±0,09)	1,4 (±0,17)	0,94 (±0,02)	***###/▲▲▲ 1,52 (±0,11)	1,03 (±0,05)	1,03 (±0,07)
	Arc	1 (±0,03)	***##### 1,24 (±0,03)	1,04 (±0,02)	**** 1,31 (±0,02)	1,23 (±0,02)	0,92 (±0,03)	1,25 (±0,01)	****##### 1,6 (±0,06)	▲▲▲▲ 1,22 (±0,03)	0,93 (±0,03)	1,16 (±0,07)	1,23 (±0,01)	1,23 (±0,03)	***##### 1,32 (±0,04)	1,24 (±0,02)	1,13 (±0,03)
CPu	GluA1	1 (±0,02)	1,02 (±0,03)	0,81 (±0,03)	0,84 (±0,04)	1,01 (±0,05)	0,78 (±0,02)	0,85 (±0,01)	0,69 (±0,02)	0,75 (±0,02)	0,78 (±0,02)	0,81 (±0,03)	0,9 (±0,08)	0,91 (±0,08)	0,98 (±0,11)	0,84 (±0,06)	0,87 (±0,18)
	GluA2/3	1 (±0,02)	0,71 (±0,04)	0,85 (±0,01)	0,71 (±0,03)	0,86 (±0,02)	0,78 (±0,02)	0,8 (±0,02)	0,69 (±0,02)	0,75 (±0,03)	###/▲▲▲ 1,19 (±0,20)	0,83 (±0,01)	0,83 (±0,02)	0,75 (±0,03)	** 0,64 (±0,02)	0,76 (±0,02)	0,95 (±0,07)
	Arc	1 (±0,07)	1,07 (±0,11)	1,2 (±0,04)	1,02 (±0,13)	1,18 (±0,08)	1,06 (±0,11)	1,19 (±0,09)	1,15 (±0,08)	▲▲▲ 1,29 (±0,08)	0,73 (±0,03)	1,3 (±0,08)	1,2 (±0,04)	1,2 (±0,07)	***### 1,54 (±0,03)	1,25 (±0,03)	1,33 (±0,04)
	TH	1 (±0,02)	*** 0,54 (±0,01)	1 (±0,02)	*** 0,59 (±0,01)	0,97 (±0,01)	0,59 (±0,06)	1,02 (±0,02)	0,63 (±0,02)	▲▲▲ 1,13 (±0,02)	***##### 0,76 (±0,02)	▲▲▲ 1,15 (±0,02)	**##### 0,85 (±0,01)	▲▲▲ 1,12 (±0,01)	##### 0,9 (±0,03)	▲▲▲ 1,13 (±0,02)	##### 0,9 (±0,02)
	Neurofilamentos	1 (±0,05)	1,02 (±0,04)	0,99 (±0,01)	0,87 (±0,11)	0,91 (±0,01)	0,92 (±0,02)	0,98 (±0,12)	0,53 (±0,01)	1,08 (±0,02)	1,02 (±0,02)	0,92 (±0,01)	0,85 (±0,03)	0,96 (±0,03)	0,97 (±0,08)	1,09 (±0,08)	1,01 (±0,07)
	MAP2	1 (±0,01)	0,9 (±0,01)	0,91 (±0,06)	0,81 (±0,04)	0,95 (±0,05)	0,84 (±0,01)	1 (±0,01)	0,81 (±0,01)	1,04 (±0,07)	1,15 (±0,02)	1,07 (±0,01)	**#####/▲ 1,31 (±0,03)	1,04 (±0,06)	**##### 1,31 (±0,05)	1,23 (±0,13)	***##### 1,42 (±0,07)
	BDNF	1 (±0,04)	1,04 (±0,01)	1,01 (±0,06)	1 (±0,04)	1,03 (±0,05)	1,11 (±0,03)	1,05 (±0,04)	0,94 (±0,02)	1,2 (±0,06)	***##### 1,36 (±0,06)	*/▲▲▲ 1,23 (±0,02)	0,86 (±0,04)	** 1,3 (±0,04)	1,11 (±0,02)	*** 1,31 (±0,04)	## 1,19 (±0,07)
SN	Arc	1 (±0,03)	1,05 (±0,02)	1,1 (±0,01)	1,06 (±0,07)	1,07 (±0,01)	1,07 (±0,10)	1,11 (±0,04)	0,92 (±0,05)	1,03 (±0,01)	1,15 (±0,01)	1,08 (±0,01)	1,11 (±0,05)	1,13 (±0,01)	1,02 (±0,06)	1,11 (±0,08)	0,99 (±0,07)
	TH	1 (±0,01)	*** 0,24 (±0,01)	1,04 (±0,01)	*** 0,21 (±0,02)	0,99 (±0,04)	0,27 (±0,01)	1 (±0,01)	0,27 (±0,05)	▲▲▲ 0,97 (±0,01)	***##### 0,43 (±0,01)	▲▲▲ 1,09 (±0,03)	***##### 0,43 (±0,01)	▲▲▲ 1,05 (±0,01)	***### 0,4 (±0,01)	▲▲▲ 1,06 (±0,03)	***##### 0,43 (±0,01)
	MAP2	1 (±0,01)	1,04 (±0,02)	1,05 (±0,01)	1,18 (±0,01)	1,07 (±0,05)	1,19 (±0,01)	0,82 (±0,08)	1,13 (±0,03)	* 1,23 (±0,01)	1,07 (±0,02)	1,1 (±0,03)	* 1,23 (±0,02)	1,17 (±0,07)	1,2 (±0,01)	1 (±0,05)	***/▲▲▲ 1,35 (±0,02)
	Arborização DA	1 (±0,01)	**** 0,17 (±0,02)	1,06 (±0,01)	**** 0,36 (±0,02)	1,02 (±0,01)	0,41 (±0,11)	1,1 (±0,03)	0,31 (±0,11)	▲▲ 0,92 (±0,01)	***##### 0,65 (±0,06)	▲▲▲▲ 1,08 (±0,03)	**** 0,42 (±0,02)	▲▲▲▲ 1,12 (±0,02)	*** 0,59 (±0,05)	▲▲▲▲ 0,99 (±0,01)	**** 0,49 (±0,01)
	BDNF	1 (±0,04)	1,05 (±0,05)	1 (±0,06)	1,14 (±0,03)	1,01 (±0,01)	1 (±0,02)	0,96 (±0,06)	0,92 (±0,01)	1,06 (±0,04)	1,12 (±0,01)	1,1 (±0,09)	1,14 (±0,02)	1,14 (±0,06)	1,03 (±0,01)	1,2 (±0,06)	1,08 (±0,01)

Dados expressos em média e SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,00001 vs. grupo controle. #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001; ####p<0,0001 comparação entre grupos 6-OHDA e 6-OHDA+Ex. ▲p<0,05; ▲▲p<0,01; ▲▲▲p<0,001; ▲▲▲▲p<0,0001 comparação entre grupos Ex e 6-OHDA+Ex.

Tabela 2 – Efeitos dos diferentes tempos de exercício físico no encéfalo de animais após a indução do modelo de DP por 6-OHDA. Análise realizada pela técnica de *immunoblotting*.

Região	Proteína	SED 1 m (Ctl)	6-OHDA 1 m	SED 2 m	6-OHDA 2 m	SED 3 m	6-OHDA 3 m	SED 4 m	6-OHDA 4 m	EX 1 m	6-OHDA+Ex 1 m	EX 2 m	6-OHDA+Ex 2 m	EX 3 m	6-OHDA+Ex 3 m	EX 4 m	6-OHDA+Ex 4 m
Córtex Motor	GluA1	1 (±0,17)	0,8 (±0,13)	0,134 (±0,25)	0,88 (±0,20)	1 (±0,17)	0,77 (±0,12)	1,31 (±0,10)	0,88 (±0,23)	0,92 (±0,18)	0,32 (±0,02)	1,07 (±0,13)	0,82 (±0,11)	1,29 (±0,28)	1,29 (±0,28)	1,33 (±0,40)	0,91 (±0,05)
	GluA2/3	1 (±0,08)	1,11 (±0,22)	1,18 (±0,03)	1,66 (±0,10)	1 (±0,08)	1,54 (±0,19)	1,66 (±0,05)	1,63 (±0,17)	0,82 (±0,04)	1,38 (±0,06)	0,98 (±0,07)	2,06 (±0,07)	1,01 (±0,07)	2,03 (±0,30)	0,96 (±0,02)	1,65 (±0,11)
	Arc	1 (±0,08)	1,24 (±0,01)	1,07 (±0,06)	1,23 (±0,02)	1 (±0,18)	1,21 (±0,03)	0,87 (±0,07)	1,21 (±0,01)	***▲▲▲ 1,61 (±0,10)	1,02 (±0,06)	***▲▲▲ 1,93 (±0,26)	1,25 (±0,02)	1,08 (±0,05)	***#▲▲ 1,64 (±0,03)	1,04 (±0,09)	1,21 (±0,03)
CPU	GluA1	1 (±0,21)	1,1 (±0,02)	1,07 (±0,61)	1,23 (±0,02)	1,07 (±0,08)	1,23 (±0,05)	1,55 (±0,24)	1,27 (±0,03)	0,83 (±0,12)	1,1 (±0,12)	1,58 (±0,59)	1,29 (±0,03)	1,69 (±0,13)	1,29 (±0,07)	1,72 (±0,14)	1,8 (±0,10)
	GluA2/3	1 (±0,17)	0,87 (±0,17)	1,5 (±0,13)	0,91 (±0,06)	0,92 (±0,04)	0,89 (±0,06)	1,29 (±0,20)	0,98 (±0,07)	1,29 (±0,30)	1,48 (±0,06)	1,31 (±0,18)	1,3 (±0,13)	1,32 (±0,07)	0,99 (±0,06)	1,41 (±0,18)	1,2 (±0,03)
	Arc	1 (±0,27)	0,64 (±0,04)	1,12 (±0,23)	0,54 (±0,06)	1,3 (±0,16)	0,61 (±0,06)	1,81 (±0,11)	0,5 (±0,05)	0,83 (±0,32)	0,52 (±0,04)	1,14 (±0,14)	0,64 (±0,05)	1,89 (±0,13)	**#### 1,86 (±0,15)	▲▲▲ 1,75 (±0,14)	0,7 (±0,09)
	TH	1 (±0,12)	0,26 (±0,02)	0,97 (±0,05)	0,33 (±0,04)	0,98 (±0,05)	0,38 (±0,07)	0,99 (±0,02)	0,38 (±0,03)	▲▲▲▲ 1,03 (±0,03)	****#### 0,55 (±0,04)	▲▲▲ 1,01 (±0,03)	***### 0,62 (±0,06)	▲▲▲ 1,01 (±0,05)	*#### 0,71 (±0,07)	▲▲ 1,05 (±0,04)	### 0,76 (±0,03)
	BDNF	1 (±0,27)	1,1 (±0,01)	1,46 (±0,24)	1,28 (±0,06)	1,11 (±0,09)	1,26 (±0,05)	0,97 (±0,08)	1,14 (±0,03)	0,93 (±0,29)	1,23 (±0,11)	1,4 (±0,10)	1,33 (±0,08)	1,47 (±0,11)	1,28 (±0,03)	1,64 (±0,09)	1,94 (±0,29)
																	**
SN	Arc	1 (±0,03)	1,25 (±0,04)	1,64 (±0,05)	1,21 (±0,03)	1,77 (±0,70)	1,2 (±0,03)	1,97 (±0,05)	1,32 (±0,15)	1,49 (±0,11)	1,68 (±0,17)	2 (±0,26)	1,37 (±0,02)	2,13 (±0,14)	1,51 (±0,16)	1,88 (±0,10)	1,42 (±0,18)
	TH	1 (±0,03)	0,36 (±0,02)	0,97 (±0,08)	0,39 (±0,09)	1 (±0,03)	0,43 (±0,04)	1 (±0,11)	0,48 (±0,09)	▲▲▲▲ 1,02 (±0,04)	**** 0,44 (±0,04)	▲▲▲ 0,97 (±0,09)	*** 0,5 (±0,06)	▲▲▲ 1 (±0,01)	*** 0,48 (±0,07)	▲▲▲ 1,04 (±0,03)	*** 0,52 (±0,05)
	BDNF	1 (±0,30)	1,08 (±0,04)	1,28 (±0,20)	1,06 (±0,01)	1,39 (±0,20)	1,03 (±0,01)	1,39 (±0,11)	1,36 (±0,05)	1,13 (±0,29)	1,15 (±0,03)	1,11 (±0,09)	1,16 (±0,04)	1,33 (±0,22)	1,16 (±0,04)	1,44 (±0,16)	1,5 (±0,12)

Dados expressos em média e SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,00001 vs. grupo controle. #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001; comparação entre grupos 6-OHDA e 6-OHDA+Ex. ▲p<0,05; ▲▲p<0,01; ▲▲▲p<0,001; ▲▲▲▲p<0,0001 comparação entre grupos Ex e 6-OHDA+Ex.

3.1 Neuroproteção promovida pelo exercício físico sobre os neurônios dopaminérgicos

Após injeção de 6-OHDA, alterações na expressão de TH no CPu e SNc puderam ser observadas através das técnicas de imuno-histoquímica e *immunoblotting* (Figura 3). Houve uma variação entre as técnicas utilizadas em relação ao total de morte dopaminérgica encontrada. Isso pode ter ocorrido devido à variedade entre as áreas analisadas nas diferentes técnicas. Enquanto a imuno-histoquímica analisa a região dorsolateral do CPu e a SNc, o *immunoblotting* analisa uma área maior, mostrando a expressão de proteínas no CPu como um todo e a região do mesencéfalo por inteiro.

No CPu, a análise de TH pela técnica de imuno-histoquímica mostrou significativa interação entre DP x exercício [$F(1,48)=32,443$, $p<0,0001$] e DP x tempo após a indução da DP [$F(3,48)=5,631$, $p<0,002$]. Na comparação entre grupos, observou-se redução da imunomarcação de TH nos grupos 6-OHDA 1 m, 2 m, 3 m e 4 m comparados ao grupo controle (ca. 40% em todos os grupos). Nos grupos 6-OHDA+Ex 1 m e 2 m a imunomarcação de TH também apresentou redução quando comparada ao grupo controle (ca. 20% em ambos grupos). Após 3 e 4 meses de exercício, nenhuma alteração significativa foi encontrada em relação ao controle. Comparando os grupos 6-OHDA com os grupos 6-OHDA+Ex, uma importante redução na marcação de TH foi observada em todos os grupos 6-OHDA (entre 40-50%). Ao comparar os grupos exercitados nos diferentes tempos, observou-se aumento da marcação de TH nos grupos 6-OHDA+Ex 3 m e 4 m comparados com os grupos 6-OHDA+Ex 1 m (19%, $p<0,01$ em ambos grupos) (Figura 3A e 3B). Comparando os grupos 6-OHDA+Ex com os grupos Ex, observou-se redução de aproximadamente 33% no 6-OHDA+Ex 1 m, 26% no 6-OHDA+Ex 2 m e 20% nos grupos 6-OHDA+Ex 3 m e 4 m ($p<0,001$).

A análise de TH pela técnica de *immunoblotting* mostrou interação significativa entre os fatores DP x exercício [$F(1,68)=27,181$, $p<0,0001$] e DP x tempo após a indução da DP [$F(3,68)=2,611$, $p<0,05$]. Houve uma intensa redução no nível de expressão de TH em todos os grupos 6-OHDA (ca. 65%) comparados ao grupo controle. Os grupos 6-OHDA+Ex 1 m, 2 m e 3 m mostraram diminuição da expressão de aproximadamente 40% quando

comparados ao grupo controle. Os grupos 6-OHDA+Ex 1 m, 2 m, 3 m e 4 m mostraram maior expressão de TH quando comparados aos grupos 6-OHDA 1 m, 2 m, 3 m e 4 m (111%, 88%, 86% e 100%, respectivamente) (Figura 3C). Comparando os grupos 6-OHDA+Ex com os grupos Ex notou-se redução de 47% no grupo 6-OHDA+Ex 1 m ($p<0,0001$), 39% no grupo 6-OHDA+Ex 2 m ($p<0,001$), 30% no grupo 6-OHDA+Ex 3 m ($p<0,001$) e 28% no grupo 6-OHDA+Ex 4 m ($p<0,01$).

Na SNc a análise de TH pela técnica de imuno-histoquímica mostrou interação entre DP x exercício [$F(1,48)=39,539$, $p<0,0001$] e DP x tempo após a indução da DP [$F(3,48)=3,427$, $p<0,02$]. Os dados mostraram redução da imunomarcção de TH de aproximadamente 75% nos grupos 6-OHDA comparados ao grupo controle, e aproximadamente 60% em todos os grupos 6-OHDA+Ex quando comparados ao grupo controle. A comparação dos grupos 6-OHDA com 6-OHDA+Ex, revelou uma importante redução da expressão de TH nos grupos sedentários com a DP (1m: 79%; 2m: 104%; 3m: 48% e 4m: 59%) (Figura 3D e 3E). Comparando os grupos 6-OHDA+Ex com os grupos Ex observou-se redução de aproximadamente 60% em todos os grupos 6-OHDA+Ex ($p<0,001$). A técnica de *immunoblotting* no mesencéfalo mostrou significância apenas para o fator categórico DP [$F(1,52)=345,41$, $p<0,0001$]. O pós-teste mostrou redução da expressão de TH de aproximadamente 60% nos grupos 6-OHDA comparados ao grupo controle e aproximadamente 50% nos grupos 6-OHDA+Ex comparados ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos 6-OHDA e 6-OHDA+Ex (Figura 3F). Entre os grupos Ex e 6-OHDA+Ex notou-se redução de 57% no grupo 6-OHDA+Ex 1 m, 48% no grupo 6-OHDA+Ex 2 m, 52% no grupo 6-OHDA+Ex 3 m e 50% no grupo 6-OHDA+Ex 4 m ($p<0,001$ para todos os grupos).

Figura 3 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de Tirosina Hidroxilase no CPu e SN.

A - Imagens digitais de cortes coronais do estriado (CPu) marcados para TH 1 mês após a injeção de 6-OHDA. **B** - Densidade óptica relativa de TH no CPu analisada pela técnica de imuno-histoquímica. **C** - Razão da densidade óptica da expressão de TH no CPu analisada pela técnica de *immunoblotting*. **D** - Imagens digitais de cortes coronais da substância negra (SN) marcados para TH 1 mês após a injeção de 6-OHDA. **E** - Porcentagem de células TH-positivas na SNc analisada pela técnica de imuno-histoquímica. **F** - Razão da densidade óptica da expressão de TH no mesencéfalo analisada pela técnica de *immunoblotting*. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ em relação ao grupo 6-OHDA correspondente. ## $p < 0,01$ em relação ao grupo 6-OHDA+Ex 1 m. Escala 100 μ m

Como a diferença entre os grupos exercitados e sedentários é semelhante nos diferentes tempos de treinamento, foram selecionadas imagens digitais para marcação de TH apenas dos grupos 6-OHDA 1 m e 6-OHDA+Ex 1 m que podem representar todos os outros grupos. Note que a redução na expressão de TH observados nos animais dos grupos sedentários (6-OHDA) é maior quando comparados aos grupos exercitados.

CPu: estriado; SN: substância negra; TH: tirosina hidroxilase; grupo 6-OHDA: grupo sedentário com lesão por 6-OHDA; grupo 6-OHDA+EX: grupo exercitado com lesão por 6-OHDA;

3.2 Exercício em diferentes tempos promove oscilações nos níveis de expressão dos receptores glutamatérgicos GluA1 e GluA2/3 no modelo da Doença de Parkinson

As subunidades dos receptores glutamatérgicos tipo AMPA, GluA1 e GluA2/3 foram analisadas no CxM e no CPu.

A imuno-histoquímica para GluA1 no CPu mostrou interação entre DP x exercício físico [$F(1,32)=4,279$, $p<0,04$] e exercício físico x tempo após a indução da DP [$F(3,32)=4,789$, $p<0,007$]. Porém, não houve diferenças significativa entre os grupos em ambas técnicas. Para a técnica de *immunoblotting*, não foi observado nenhuma diferença estatística para esse receptor (Figuras 4A, 4B e 4C).

No CxM, a contagem de células GluA1 positivas mostrou interação significativa entre todos os fatores categóricos: DP x exercício físico x tempo após indução da DP [$F(3,32)=3,609$, $p<0,02$]. Houve aumento da imunomarcação de GluA1 no grupo 6-OHDA+Ex 3 m quando comparado ao grupo controle (69%) e 43% quando comparado ao grupo 6-OHDA 3 m. Além disso, o grupo 6-OHDA+Ex 3 m mostrou maior número de células GluA1 positivas quando comparado aos grupos 6-OHDA+Ex 1 m, 2 m e 4 m (69%- $p<0,001$, 56%- $p<0,01$ e 50%- $p<0,01$, respectivamente) (Figura 4D e 4E). Não houve diferenças entre os grupos Ex e 6-OHDA+Ex. Entre o grupo Ex notou-se redução do grupo Ex 4 m em relação ao grupo Ex 3 m (ca. 34%, $p<0,05$).

A técnica de *immunoblotting* mostrou aumento da expressão de GluA1 no grupo 6-OHDA+Ex 3 m apenas quando comparado ao grupo 6-OHDA+Ex 1 m (ca. 300%, $p<0,05$) (Figura 4F), sendo significativa apenas os fatores categóricos DP [$F(1,44)=11,599$, $p<0,001$] e tempo após indução da DP [$F(3,44)=2,861$, $p<0,04$].

No CPu, a análise de GluA2/3 pela técnica de imuno-histoquímica mostrou interação significativa entre todos os fatores: DP x exercício físico x tempo após indução da DP [$F(3,32)=8,294$, $p<0,003$]. Dados do pós-teste mostraram redução da imunomarcação no grupo 6-OHDA 4 m (31%) e no grupo 6-OHDA+Ex 3 m (36%) quando comparados ao grupo controle. Observou-se aumento da imunomarcação de GluA2/3 no grupo 6-OHDA+Ex 1 m quando comparado ao grupo 6-OHDA 1 m (68%). Além disso, o grupo 6-OHDA+Ex 1 m

mostrou maior número de células positivas quando comparado aos grupos 6-OHDA+Ex 2 m e 3 m (43%, $p<0,01$ e 86%, $p<0,001$, respectivamente). O grupo 6-OHDA+Ex 4 m teve maior expressão de GluA2/3 quando comparado ao grupo 6-OHDA+Ex 3 m (48%, $p<0,05$) (Figura 5A e 5B). O grupo 6-OHDA+Ex 1 m mostrou maior expressão de GluA2/3 (ca. 58%) quando comparado ao grupo Ex 1 m ($p<0,001$). Os dados de GluA2/3 por *immunoblotting* mostraram significância apenas para os fatores categóricos DP [$F(1,47)=6,203$, $p<0,01$] e exercício físico [$F(1,47)=11,490$, $p<0,001$]. Não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 5C).

No CxM o a contagem de células GluA2/3 positivas pela técnica de imunohistoquímica mostrou interação significativa entre todos os fatores: DP x exercício físico x tempo após indução da DP [$F(3,32)=3,036$, $p<0,04$]. Os dados mostraram aumento do número de células GluA2/3 no grupo 6-OHDA+Ex 2 m comparado ao grupo controle (40%). O grupo 6-OHDA+Ex 3 m mostrou aumento da imunomarcacão quando comparado ao grupo controle e ao grupo 6-OHDA 3 m (52% para ambos). Além disso, o grupo 6-OHDA+Ex 3 m mostrou maior número de células quando comparado aos grupos 6-OHDA+Ex 1 m e 4 m (50% e 48%, respectivamente, $p<0,01$) e ao grupo Ex 3 m (62%, $p<0,001$). O grupo 6-OHDA+Ex 2 m mostrou aumento da imunomarcacão quando comparado ao grupo 6-OHDA+Ex 1 m (39%, $p<0,01$) (Figura 5D e 5E). Os dados de *immunoblotting* para GluA2/3 no CxM mostraram interação entre DP x exercício físico [$F(1,39)=4,463$, $p<0,04$] e exercício físico x tempo após indução da DP [$F(3,39)=5,414$, $p<0,003$] (Figura 5F), e observou-se apenas aumento da expressão no grupo 6-OHDA+Ex 1 m quando comparado ao grupo Ex 1 m (68%, $p<0,01$).

Figura 4 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de GluA1 no CPu e CxM.

A e E – Número de células marcadas para GluA1 / mm² no CPu e CxM (respectivamente) analisada pela técnica de imuno-histoquímica. **B e F** - Razão da densidade óptica da expressão de GluA1 no CPu e CxM (respectivamente) analisada pela técnica de *immunoblotting*. **C e D** - Imagens digitais de cortes coronais do CPu e CxM (respectivamente) marcados para GluA1, 1 e 3 meses após a injeção de 6-OHDA. *p<0,05 comparado ao grupo 6-OHDA 3 m; #p<0,05/##p<0,01/###p<0,001 comparados ao grupo 6-OHDA+Ex 3 m. Escala: 100 µm

As imagens digitais representam os grupos que obtiveram os resultados mais significativos e que podem representar a marcação de GluA1 dos outros grupos. Note que no CPu não há diferença significativa entre os grupos, porém, no CxM observa-se que após o 1 mês de exercício há redução da expressão de GluA1 revertido após 3 meses de treinamento.

CPu: estriado; CxM: córtex motor; GluA1: receptor glutamatérgico AMPA tipo 1; grupo 6-OHDA: grupo sedentário com lesão por 6-OHDA; grupo 6-OHDA+EX: grupo exercitado com lesão por 6-OHDA;

Figura 5 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de GluA2/3 no CPu e CxM.

A e E - Número de células marcadas para GluA2/3 / mm² no CPu e CxM (respectivamente) analisada pela técnica de imuno-histoquímica. **B e F** - Razão da densidade óptica da expressão de GluA2/3 no CPu e CxM (respectivamente) analisada pela técnica de *immunoblotting*. **C e D** - Imagens digitais de cortes coronais do CPu e CxM (respectivamente) marcados para GluA2/3, 1 e 3 meses após a injeção de 6-OHDA. ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ comparado ao correspondente grupo 6-OHDA; # $p < 0,05$ / ## $p < 0,01$ comparados ao grupo 6-OHDA+Ex 3 m; ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,01$ comparados ao grupo 6-OHDA+Ex 1m.

As imagens digitais representam os grupos que obtiveram os resultados mais significativos e podem representar a marcação de GluA2/3 dos outros grupos. Note que no CPu há aumento da expressão de GluA2/3 no primeiro mês de treinamento e é revertido após 3 meses de treinamento. No CxM parece haver um crescente aumento da expressão que diminui após 4 meses de exercício físico.

CPu: estriado; CxM: córtex motor; GluA2/3: receptor glutamatérgico AMPA tipo 2/3; grupo 6-OHDA: grupo sedentário com lesão por 6-OHDA; grupo 6-OHDA+EX: grupo exercitado com lesão por 6-OHDA; Escala: 100 μ m

3.3 Diferentes tempos de treinamento físico promovem alterações sincronizadas da expressão de Arc após indução da DP

No CPu, a análise de Arc pela técnica de imuno-histoquímica mostrou interação entre todos os fatores: DP x exercício físico x tempo após indução da DP [F (3,48)=8,859, $p<0,0009$]. Notou-se um aumento no número de células marcadas por Arc no grupo 6-OHDA+Ex 3 m comparado ao grupo controle (54%) e ao grupo 6-OHDA 3 m (44%). O grupo 6-OHDA+Ex 1 m mostrou redução da expressão de Arc quando comparado aos grupos 6-OHDA+Ex 2 m, 3 m e 4 m (39%, $p<0,01$, 53%, $p<0,0001$ e 45%, $p<0,0001$, respectivamente) (Figura 6A e 6C). Comparando os grupos Ex e 6-OHDA+Ex, notou-se redução do grupo 6-OHDA+Ex 1 m de 43% ($p<0,001$). A técnica de *immunoblotting* mostrou interação entre DP x exercício [F (1,55)=4,578, $p<0,03$], DP x tempo após indução da DP (F (3,55)=9,173, $p<0,0001$) e exercício físico x tempo após indução da DP [F (3,55)=13,069, $p<0,0001$]. Houve aumento da expressão de Arc no grupo 6-OHDA+Ex 3m comparado ao grupo controle (89%) e ao grupo 6-OHDA 3m (200%). Além disso, o grupo 6-OHDA+Ex 3 m mostrou aumento da expressão de Arc quando comparado aos grupos 6-OHDA+Ex 1 m, 2 m e 4 m (262%- $p<0,0001$, 195%- $p<0,0001$ e 170%- $p<0,001$, respectivamente) (Figura 6B). Comparando os grupos Ex e 6-OHDA+Ex observou-se redução no grupo 6-OHDA+Ex 1 m de 60% ($p<0,001$). Além disso, observou aumento da expressão de Arc no grupo Ex 3 m quando comparado ao grupo Ex 1 m (127%, $p<0,001$) e ao grupo Ex 2 m (66%, $p<0,05$). O grupo Ex 4 m mostrou maior expressão também quando comparado ao grupo Ex 1 m (110%, $p<0,01$).

Na SN, a expressão de Arc não mostrou interações significativas. Apenas os grupos Ex 2 m e Ex 3 m mostraram aumento da expressão comparados ao grupo controle (100%, $p<0,05$ e 113%, $p<0,01$, respectivamente) representados pela técnica de imuno-histoquímica.

Além dessas duas estruturas, observou-se alterações na expressão de Arc no CxM dos animais estudados. Os grupos 6-OHDA 1 m, 2 m e 4 m mostraram aumento do número de células Arc positivas quando comparados ao grupo controle (ca. 24%, 31% e 60%, respectivamente). O grupo 6-OHDA+Ex 2 m revelou aumento do número de células quando comparado ao grupo controle (23%). O grupo 6-OHDA+Ex 3 m mostrou aumento da imunomarcagem de 32%

quando comparado ao grupo controle e 43% quando comparado ao grupo 6-OHDA 3 m. O grupo 6-OHDA+Ex 1 m mostrou redução da imunomarcação de Arc quando comparado ao grupo 6-OHDA 1 m (25%) e aos grupos 6-OHDA+Ex 2 m, 3 m e 4 m (24% $p<0,0001$, 29% $p<0,0001$ e 17% $p<0,01$, respectivamente). O grupo 6-OHDA+Ex 4 m mostrou redução da imunomarcação de Arc comparado ao grupo 6-OHDA 4 m (29%). O grupo 6-OHDA 3 m mostrou menor imunomarcação de Arc comparado aos grupos 6-OHDA 1 m, 2 m e 4 m (26%, 29% e 42%, respectivamente, $p<0,0001$). O grupo 6-OHDA 4 m mostrou aumento da marcação quando comparado ao grupo 6-OHDA 1 m (29%, $p<0,0001$) e ao grupo 6-OHDA 2 m (22%, $p<0,0001$) (Figura 6D e 6E). O grupo Ex 1 m mostrou aumento da imunomarcação quando comparado aos grupos controle (22%, $p<0,001$) e 6-OHDA+Ex 1 m (31%, $p<0,0001$).

Os resultados de *immunoblotting* revelaram aumento da expressão de Arc no grupo 6-OHDA+Ex 3 m comparado ao grupo controle (64%) e ao grupo 6-OHDA 3 m (35%). Além disso, o grupo 6-OHDA+Ex 3 m mostrou maior expressão de Arc quando comparado aos grupos 6-OHDA+Ex 1 m, 2 m e 4 m (ca. 60% $p<0,001$; 31% $p<0,05$ e 36% $p<0,05$, respectivamente) (Figura 6F). Os grupos Ex 1 m e Ex 2 m mostraram maior expressão de Arc comparados ao grupo controle (61% e 93%, respectivamente, $p<0,001$). O grupo Ex 1 m e Ex 2 m mostraram aumento da expressão comparado aos grupos 6-OHDA+Ex 1 m e 6-OHDA+Ex 2 m (58% e 54%, respectivamente, $p<0,001$). O grupo 6-OHDA+Ex 3 m mostrou aumento da expressão comparado ao grupo Ex 3 m (52%, $p<0,01$). Comparando os grupos Ex em diferentes tempos observou-se aumento da expressão de Arc nos grupos Ex 1 m e Ex 2 m quando comparado aos grupos Ex 3 m (49%, $p<0,01$ e 79%, $p<0,001$, respectivamente) e ao grupo Ex 4 m (55%, $p<0,01$ e 85%, $p<0,001$, respectivamente). Houve interação entre todos os fatores e ambas técnicas (DP x exercício físico x tempo após indução da DP) [$F(3,80)=43,635$, $p<0,0001$] - para imuno-histoquímica e [$F(3,46)=13,290$, $p<0,0001$] para *immunoblotting*.

Figura 6 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de Arc no CPu e CxM.

A e E – Número de células marcadas para Arc / mm² no CPu e CxM (respectivamente) analisada pela técnica de imuno-histoquímica. **B e F** - Razão da densidade óptica da expressão de Arc no CPu e CxM (respectivamente) analisada pela técnica de *immunoblotting*. **C e D** - Imagens digitais de cortes coronais do CPu e CxM (respectivamente) marcados para Arc, 1 e 3 meses após a injeção de 6-OHDA. **p<0,05/**p<0,01/****p<0,0001 comparado ao correspondente grupo 6-OHDA; #p<0,01/###p<0,01 vs grupo 6-OHDA+Ex 1 m; °p<0,05/°°p<0,01/°°°p<0,001/°°°°p<0,0001 vs grupo 6-OHDA+Ex 3 m; &&&&p<0,0001 vs grupo 6-OHDA 3 m. Escala: 100 µm

As imagens digitais representam os grupos que obtiveram os resultados mais significativos e podem representar a marcação de Arc dos outros grupos. Note que no CPu há redução da expressão de Arc no primeiro mês de treinamento e é revertido após 3 meses de exercício. No CxM os resultados parecem ser semelhantes ao CPu.

CPu: estriado; CxM: córtex motor; Arc: proteína do citoesqueleto regulada por atividade; grupo 6-OHDA: grupo sedentário com lesão por 6-OHDA; grupo 6-OHDA+EX: grupo exercitado com lesão por 6-OHDA;

3.4 A maior alteração da expressão de BDNF ocorre após 1 mês de exposição ao exercício físico.

No CPu, BDNF mostrou pela técnica de imuno-histoquímica interação entre todos os fatores: DP x exercício físico x tempo após indução da DP [F (3,48)=6.729, $p<0.0007$]. Houve aumento da imunomarcagem de BDNF no grupo 6-OHDA+Ex 1 m comparado ao grupo controle (35%), 31% quando comparado ao grupo 6-OHDA 1 m, 36% quando comparado ao grupo 6-OHDA+Ex 2 m e 18% quando comparado ao grupo 6-OHDA+Ex 3 m. Os grupos Ex 2 m, 6-OHDA+Ex 3 m e 4 m mostraram aumento da marcação de BDNF quando comparados ao grupo 6-OHDA+Ex 2 m (43%, $p<0,001$; 29%, $p<0,05$ e 38%, $p<0,001$, respectivamente). Além disso, o grupo 6-OHDA+Ex 4 m mostrou aumento da expressão de BDNF quando comparado ao grupo 6-OHDA 4 m (28%) (Figura 7A e 7B). Os grupos Ex 2 m, Ex 3 m e Ex 4 m mostraram aumento do número de células marcadas quando comparados ao grupo controle (23%, $p<0,05$; 30%, $p<0,01$ e 31%, $p<0,001$, respectivamente).

A análise de BDNF pela técnica de *immunoblotting* mostrou interação entre exercício físico x tempo após indução da DP [F (3,80)=4.752, $p<0.004$]. Os dados mostraram aumento da expressão de BDNF no grupo 6-OHDA+Ex 4 m comparado ao grupo controle (93%) (Figura 7C).

Na SN, os dados de BDNF pela técnica de imuno-histoquímica mostrou interação significativa entre os fatores: DP x tempo após indução da DP [F (3,32)=3.831, $p<0.02$]. Não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 7D e 7E). A análise de BDNF pela técnica de *immunoblotting* mostrou significância apenas para o fator categórico tempo após indução da DP [F (3,64)=3.782, $p<0.01$], e também não houve diferença entre os grupos (Figura 7F).

Figura 7 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de BDNF CPu e SN.

A e E – Número de células marcadas para BDNF / mm² no CPu e SN (respectivamente) analisada pela técnica de imuno-histoquímica. **B e F** - Razão da densidade óptica da expressão de BDNF no CPu e mesencéfalo (respectivamente) analisada pela técnica de *immunoblotting*. **C e D** - Imagens digitais de cortes coronais do CPu e SN (respectivamente) marcados para BDNF, 1 e 2 meses após a injeção de 6-OHDA. **p<0,01/***p<0,001 comparado ao correspondente grupo 6-OHDA; #p<0,05/###p<0,001 vs grupo 6-OHDA+Ex 1 m; °p<0,05/°°°p<0,001 vs grupo 6-OHDA+Ex 2 m. Escala: 100 µm

As imagens digitais representam os grupos que obtiveram os resultados mais significativos e podem representar a marcação de BDNF dos outros grupos. Note que no CPu há aumento da expressão de BDNF no primeiro mês de treinamento, revertido no segundo mês de exercício e volta a aumentar novamente no quarto mês de treinamento. Na SN os resultados não mostram diferenças significantes entre os grupos.

CPu: estriado; SN: substância negra; BDNF: fator neurotróficos derivado do encéfalo; grupo 6-OHDA: grupo sedentário com lesão por 6-OHDA; grupo 6-OHDA+EX: grupo exercitado com lesão por 6-

3.5 Redução da expressão de neurofilamentos 4 meses após a indução da DP em ratos não treinados

No CPu, a análise da expressão de neurofilamentos pela técnica de imunohistoquímica mostrou interação significativa entre todos os fatores: DP x exercício físico x tempo após indução da DP [$F(3,32)=2,963$, $p<0,05$]. Houve redução da imunomarcagem de PAN no grupo 6-OHDA 4 m quando comparado ao grupo controle (41%) e aos grupos 6-OHDA 1 m (48%), 6-OHDA 2 m (48%) e 6-OHDA 3 m (43%). Por outro lado, o grupo 6-OHDA+Ex 4 m mostrou aumento da expressão de neurofilamentos quando comparado ao grupo 6-OHDA 4 m (50%) (Figura 8).

Figura 8 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão dos neurofilamentos no CPu.

A - Imagens digitais de cortes coronais do CPu marcados para neurofilamentos, 1 e 4 meses após a injeção de 6-OHDA. **B** - Densidade óptica relativa dos neurofilamentos no CPu analisada pela técnica de imuno-histoquímica. ** $p < 0,01$ comparado ao correspondente grupo 6-OHDA; # $p < 0,05$ /## $p < 0,01$ /### $p < 0,001$ vs grupo 6-OHDA 4 m. Escala: 100 μ m

As imagens digitais representam os grupos que obtiveram os resultados mais significativos e podem representar a marcação dos neurofilamentos dos outros grupos. Note que há uma intensa redução da expressão de neurofilamentos 4 meses após a indução da DP no grupo 6-OHDA o que não ocorre com os grupos treinados.

CPu: estriado; grupo 6-OHDA: grupo sedentário com lesão por 6-OHDA; grupo 6-OHDA+EX: grupo exercitado com lesão por 6-OHDA;

3.6 Análise de arborização dendrítica após a indução do modelo da DP e o protocolo de treinamento físico

No CPu, a análise de MAP2 pela técnica de imuno-histoquímica mostrou interação entre os fatores: DP x exercício físico [$F(1,36)=40,782$, $p<0,0001$] e exercício físico x tempo após indução da DP [$F(3,36)=5,127$, $p<0,005$]. Os grupos 6-OHDA+Ex 2 m, 6-OHDA+Ex 3 m e 6-OHDA+Ex 4 m mostraram aumento da imunomarcacão de MAP2 quando comparados ao grupo controle (31%, 31% e 41%, respectivamente) e quando comparado aos seus respectivos grupos sedentários 6-OHDA 2 m (62%), 6-OHDA 3 m (56%) e 6-OHDA 4 m (74%) (Figura 9A e 9B). O grupo 6-OHDA+Ex 2 m mostrou aumento da marcação quando comparado ao grupo Ex 2 m (22%, $p<0,05$) e o grupo Ex 4 m mostrou aumento da marcação comparado ao grupo Ex 1 m (18%, $p<0,05$).

Na SN, a análise de MAP2 pela técnica de imuno-histoquímica mostrou interação significativa entre os fatores: DP x tempo após indução da DP [$F(3,40)=15,532$, $p<0,0001$] e exercício físico x tempo após indução da DP [$F(3,40)=3,436$, $p<0,02$]. Houve aumento da imunomarcacão de MAP2 no grupo 6-OHDA+Ex 4m quando comparado ao grupo controle (35%), ao grupo 6-OHDA+Ex 1m (27%) e ao grupo Ex 4 m (35%, $p<0,001$). Além disso, o grupo 6-OHDA+Ex 2 m também revelou aumento da marcação quando comparado ao grupo controle (35%) (Figura 10A e 10B). O grupo Ex 1 m mostrou aumento da marcação quando comparado ao grupo 6-OHDA+Ex 1 m (15%, $p<0,05$).

Foi realizada também a quantificação da arborização dendrítica dopaminérgica na região da SN. A análise de TH (não incluso a marcação dos corpos celulares, apenas da ramificação) pela técnica de imuno-histoquímica mostrou interação entre todos os fatores: DP x exercício físico x tempo após indução da DP [$F(3,34)=6,786$, $p<0,001$]. Dados da comparação entre os grupos mostrou que há redução da imunomarcacão no grupo 6-OHDA 1 m quando comparado aos grupos controle (83%), 6-OHDA 3m (58%) e 6-OHDA+Ex 1 m (73%). Além disso, os grupos 6-OHDA 2 m, 6-OHDA 3 m e 6-OHDA 4 m também mostraram redução da imunomarcacão quando comparados ao grupo controle (64%, 59% e 70%, respectivamente). Todos os grupos exercitados também mostraram redução da imunomarcacão quando comparados ao grupo controle (1 mês: 36%; 2 meses: 58%; 3 meses: 41% e 4 meses: 52%) (Figura 10C e 10D).

Os grupos 6-OHDA+Ex mostraram redução da imunomarcacão quando comparados aos grupos Ex (1 m: 30%, $p<0,01$; 2m: 61%, $p<0,0001$; 3m: 47%, $p<0,0001$ e 4 m: 50%, $p<0,0001$).

Figura 9 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de MAP2 no CPu.

A - Imagens digitais de cortes coronais do CPu marcados para MAP2, 1 e 3 meses após a injeção de 6-OHDA. **B** - Densidade óptica relativa de MAP2 no CPu analisada pela técnica de imunohistoquímica. *** $p < 0,001$ comparado ao correspondente grupo 6-OHDA. Escala: 100 μ m

As imagens digitais representam os grupos que obtiveram os resultados mais significativos e podem representar a marcação de MAP2 dos outros grupos. Note que a partir do segundo mês após indução da DP a expressão de MAP2 é maior nos grupos treinados comparados aos grupos sedentários.

CPu: estriado; MAP2: proteína associada ao microtúbulo 2; grupo 6-OHDA: grupo sedentário com lesão por 6-OHDA; grupo 6-OHDA+EX: grupo exercitado com lesão por 6-OHDA;

Figura 10 - Efeitos do exercício físico sobre a expressão de MAP2 e ramificações dopaminérgicas na SN.

A e D - Densidade óptica relativa das ramificações dopaminérgicas e MAP2 na SN (respectivamente) analisada pela técnica de imuno-histoquímica. **B e C** - Imagens digitais de cortes coronais da SN marcados para TH e MAP2, 1 e 3 meses após a injeção de 6-OHDA. *** $p < 0,001$ comparado ao correspondente grupo 6-OHDA; # $p < 0,05$ vs grupo 6-OHDA 1 m; ■ $p < 0,05$ vs grupo 6-OHDA+Ex 1 m. Escala: 100 μ m

As imagens digitais representam os grupos que obtiveram os resultados mais significativos e podem representar a marcação de MAP2 e TH dos outros grupos. Note que quando analisado os dendritos como um todo, a diferença entre grupos ocorre apenas após 4 meses de exercício. Quando analisado as ramificações dopaminérgicas, logo no primeiro mês de exercício há maior expressão comparado ao grupo sedentário.

SN: substância negra; TH: tirosina hidroxilase; MAP2: proteína associada ao microtúbulo 2; grupo 6-OHDA: grupo sedentário com lesão por 6-OHDA; grupo 6-OHDA+EX: grupo exercitado com lesão por 6-OHDA;

As marcações para ramificações dopaminérgicas foram realizadas com o anticorpo contra TH. As imagens referidas aos corpos celulares não foram analisadas, apenas as ramificações.

4 DISCUSSÃO

Nos últimos anos com o aumento da expectativa de vida o número de pessoas com doenças neurodegenerativas, sendo a DP a segunda mais frequente, aumentaram significativamente gerando um aumento de idosos que requer cuidados especiais e maior atenção do mundo científico. Assim, a cada dia há um aumento do número de estudos que têm o interesse em investigar tratamentos para a DP que possam alterar a progressão da doença e/ou impedir ou retardar o início da mesma. O exercício físico tem mostrado ser capaz de ser neuroprotetor, diminuindo a morte de neurônios dopaminérgicos, e consequentemente, a perda de DA em modelos de DP. Além disso, o exercício pode também promover uma restauração/recuperação, permitindo uma melhor neurotransmissão dopaminérgica pelos neurônios dopaminérgicos remanescentes, e assim uma melhora dos déficits motores. Em busca de um maior conhecimento sobre como o exercício físico pode promover tais benefícios, o propósito deste estudo foi investigar os efeitos do exercício físico realizado a curto e longo prazo no encéfalo de ratos submetidos a indução de DP por injeções 6-OHDA unilateralmente. Desta forma podemos correlacionar e/ou observar a sincronia das alterações que ocorrem durante longos períodos de treinamento físico após a indução do modelo da DP.

Primeiramente, é necessário lembrar que os protocolos utilizados em estudos anteriores são diversos, o que muitas vezes torna os resultados controversos, visto que variáveis como intensidade, modalidade, regime de treinamento são imprescindíveis para tornar o exercício benéfico ou não ao sistema nervoso central (ARIDA et al., 2011; REAL et al., 2015). Nosso estudo utiliza um protocolo de treinamento já descrito na literatura pelo nosso grupo (REAL et al., 2013), e que tenta reproduzir um nível de treinamento mais próximo da realidade de pacientes com DP (HERMAN et al., 2007).

Quanto aos níveis de expressão de TH este estudo mostrou que os animais que realizam exercício físico, independentemente do tempo realizado, se a curto ou longo prazo, revelaram maior expressão de TH no CPu e na SNc do que aqueles animais não expostos ao exercício. Podemos sugerir assim que durante o primeiro mês de treinamento, quando a droga 6-OHDA pode estar ativa e

promover morte celular, a maior expressão de fibras TH-positivas e maior número de células TH-positivas pode ser considerado um efeito neuroprotetor promovido pelo exercício. Por outro lado, nos meses seguintes, com a continuidade da prática do protocolo de exercício físico, notamos um aumento progressivo na expressão de TH nos animais treinados, principalmente 3 e 4 meses, sugerindo não apenas uma neuroproteção à droga 6-OHDA, mas também recuperação dopaminérgica estriatal. Em outros estudos com modelos de DP distintos (6-OHDA, MPTP, LPS) e com o tempo e intensidade de treinamento físico diversos (9 dias, 14 dias, 4 semanas, 18 semanas) foi possível notar que sempre há uma neuroproteção dopaminérgica tanto na SNc quanto no CPu naqueles animais que são submetidos ao exercício físico (LAU et al., 2011; REAL et al., 2013; TILLERSON et al., 2003; YOON et al., 2007).

Nosso estudo mostrou que apenas após 3 e 4 meses de treinamento, as mudanças nos níveis de TH não foram significativas quando comparadas àqueles animais sem lesão. Isso difere de outros estudos, onde em protocolos de exercício físico a curto prazo, notou-se os níveis de TH semelhantes ao grupo controle (REAL et al., 2013; TAJIRI et al., 2010). Isso pode ter ocorrido devido a dose de 6-OHDA administrada nos animais em nosso estudo. As lesões dos animais dos estudos anteriores utilizaram lesões que podem ser consideradas leves (5-6 μg / μL de 6-OHDA), ao passo que no presente estudo, utilizou-se uma dose maior (12 μg / μL de 6-OHDA), podendo ser a explicação para a expressão de TH precisar de mais tempo para retornar aos níveis basais nos animais exercitados. Este aumento progressivo de TH quando o exercício é realizado em um longo prazo pode estar relacionado com mecanismos compensatórios envolvidos na tentativa de manter uma concentração suficiente de DA no CPu, o que inclui o aumento da síntese, do metabolismo e da liberação de DA (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002; ZIGMOND et al., 1990).

Ainda observando as alterações nos níveis de TH, alguns estudos trazem protocolos que mostram os benefícios do exercício físico quando este é realizado não apenas depois da indução da doença, mas também quando ele é realizado antes da indução, mostrando uma possível forma de prevenção da DP (REAL et al., 2013; ZIGMOND et al., 1990). Esses estudos mostram que a realização de exercício, seja ele voluntário (exercício o qual o animal é exposto a uma roda

giratória e o próprio animal determina quanto e quando irá realizar o exercício), seja em esteira (considerado um exercício forçado pois quem determina os parâmetros do exercício é o pesquisador) pode promover maior neuroproteção quando comparados aos animais que não realizaram exercício ou que realizaram exercício apenas após a indução da doença (LAU et al., 2011; REAL et al., 2013). Os autores sugerem que quando o exercício é realizado antes da indução da doença, o sistema nervoso já está protegido, ou seja, mecanismos protetores já estão ativados, como por exemplo, os sistemas antioxidantes endógenos, aumento de fatores neurotróficos, o que pode atenuar a perda dopaminérgica sofrida com a ação da 6-OHDA.

4.1 Fator neurotrófico derivado do encéfalo

O envolvimento do BDNF na neuroproteção promovida pelo exercício é alvo de muitos estudos devido sua função na sobrevivência e manutenção dos neurônios dopaminérgicos (REAL et al., 2013; TAJIRI et al., 2010; WU et al., 2011). Podemos observar neste estudo que há uma relação entre a neuroproteção dopaminérgica visualizada pelo aumento de TH com o aumento da expressão de BDNF após o 1 mês de exercício físico. O mesmo não ocorre com os animais sedentários, corroborando os dados de outros estudos. Podemos observar no nosso estudo que com a continuidade da realização de exercício a expressão de BDNF diminui (2 e 3 meses de exercício) e volta a aumentar novamente no último mês de treinamento. Nossos dados ainda mostram que os animais que não foram induzidos ao modelo de DP e fazem exercício não revelaram essa redução (principalmente no segundo mês de treinamento), sugerindo que a DP pode promover mudanças variáveis, não linear na expressão dos níveis de BDNF. Com 8 semanas de treinamento, um estudo mostrou que houve aumento no nível de BDNF estriatal comparando com ratos sedentários, não corroborando nossos dados. Essas diferenças podem ocorrer devido a utilização de um protocolo de treinamento, com maior intensidade e maior frequência de exercício, além dos animais terem uma lesão por 6-OHDA mais leve (TUON et al., 2012). 18 semanas de treinamento também revelou aumento da expressão de BDNF apenas na SN e não no estriado, sendo outro estudo com dados distintos dos nossos. Além disso, os autores observam aumento de outro fator neurotrófico, GDNF, na SN e no estriado (LAU et al.,

2011). Embora a expressão de BDNF tenha um papel importante em mecanismos neuroprotetores, oscilações em seus níveis parecem fazer parte de um grande balanço envolvendo vários outros mecanismos de compensação na tentativa de preservar a perda dopaminérgica e atenuar déficits motores. Sabe-se que a expressão de GDNF atua diretamente na ativação da CREB, regulando a transcrição do gene TH, podendo assim, aumentar a atividade da enzima. O VEGF atua indiretamente na sobrevivência dopaminérgica através da regulação da angiogênese e do aporte sanguíneo, além de reduzir a ativação de proteínas pró-apoptóticas. Há vários estudos que mostram que esses fatores também podem ser modulados pelo exercício físico (AL-JARRAH et al., 2010; COHEN; ZIGMOND; SMITH, 2011; LAU et al., 2011), e desta forma, podem participar desse mesmo balanço, participando de mecanismos compensatórios à depleção dopaminérgica.

4.2 Proteínas estruturais

Vários estudos mostram a ação do exercício físico no remodelamento dendrítico e axonal. Esses mostram que tanto a curto como a longo prazo, o exercício é capaz de promover aumento na densidade dessas estruturas (FERREIRA et al., 2010; GARCIA et al., 2012). A redução da expressão de dendritos dopaminérgicos visto em todos os grupos do estudo pode ser explicada pela ação da 6-OHDA, que é transportada não somente para os corpos celulares, mas também para os dendritos dos neurônios catecolaminérgicos (DEUMENS et al., 2002), fazendo com que sua neurotoxicidade provoque déficits metabólicos prejudicando a função da estrutura como um todo (BLUM et al., 2001). Ao quantificar a arborização dendrítica como um todo na SNc, notamos que não há diferenças entre os grupos nos 3 primeiros meses de treinamento. Essa diferença começa a acontecer no último mês de treinamento nos animais exercitados. Porém, quando analisamos a arborização dendrítica dopaminérgica, notamos que as diferenças se tornam mais evidentes entre os grupos. Podemos notar nos nossos dados que o exercício físico foi capaz de promover uma neuroproteção após 1 mês de treinamento, permitindo que a redução dos dendritos dopaminérgicos não seja tão grande quanto à perda nos animais sedentários. Essa maior arborização dendrítica pode propiciar maior estabelecimento de novas sinapses, incluindo assim, mais um benefício do

exercício físico nos mecanismos compensatórios da depleção dopaminérgica na DP (DERKSEN et al., 2007). Existem outros estudos que mostram que o exercício físico em esteira resulta em um aumento na densidade de espinhos dendríticos no CPu de modelos animais da DP por MPTP. Além disso, esses animais com depleção dopaminérgica revelaram uma redução da densidade espinhal nos MSNs que expressam receptores dopaminérgicos D1 e D2 das vias direta e indireta. Porém, com a exposição desses animais ao exercício, essa redução não ocorre, o que pode mostrar que o exercício tem um efeito positivo sobre a conectividade dos núcleos da base (COMERY; SHAH; GREENOUGH, 1995; TOY et al., 2014). No nosso estudo, no CPu dos animais exercitados, observamos que há um aumento progressivo ao longo dos meses de treinamento da expressão de MAP2. Além disso, pode-se notar que após 2 meses de treinamento, o aumento da expressão de MAP2 é maior nos animais induzidos ao modelo da DP, podendo sugerir um remodelamento dendrítico como resposta compensatória dos neurônios remanescentes nessa estrutura, proporcionando um possível rearranjo da arborização, reafirmando os efeitos positivos do exercício na intenção de manter a atividade sináptica dessa região. Quando observamos os neurofilamentos no CPu, nota-se que não há diferenças significativas entre os grupos nos 3 primeiros meses de treinamento. A densidade das fibras axonais apenas diminui nos animais sedentários após um longo prazo de lesão, o que não ocorre nos animais do grupo exercitado mesmo após 4 meses de indução do modelo da DP. Talvez, com a morte neuronal na SNc, a longo prazo, comece a ocorrer morte dos axônios que já não estão mais sendo utilizados, e como uma forma de plasticidade esses neurofilamentos comecem a sofrer apoptose. Por outro lado, com o exercício físico as células parecem ser capazes de manter a expressão dos neurofilamentos, que representam um dos principais componentes do citoesqueleto neuronal (AL-CHALABI; MILLER, 2003; GOTOW, 2000; HOFFMAN et al., 1987). Sabe-se que a expressão de neurofilamentos está relacionada diretamente com a área axonal que é um dos determinantes na velocidade da condução nervosa (HOFFMAN et al., 1987). Desta forma, a manutenção adequada da expressão dos neurofilamentos após um longo período da ação da droga 6-OHDA pode ser importante para um sistema que se encontra com grandes déficits provocados pela doença.

4.3 Sistema glutamatérgico e Arc

A depleção dopaminérgica nos núcleos da base provoca hiperexcitabilidade glutamatérgica corticoestriatal ao nível dos MSN estriatais, o que contribui para os déficits motores da DP (CALABRESI et al., 2007; VANLEEUEWEN et al., 2010). Estudos mostram que o exercício físico pode reduzir a hiperatividade corticoestriatal diminuindo a condutância mediada por receptores AMPA. Isto ocorre porque quando os receptores AMPA é composto pela subunidade GluA2, há uma redução na permeabilidade de Ca^{2+} o que leva a uma baixa condutância, devido ao impedimento de fluxo de Ca^{2+} (ISAAC et al., 2007; PETZINGER et al., 2013; VANLEEUEWEN et al., 2010). Nossos dados mostram que o exercício físico em esteira, mesmo a curto prazo, já promove um aumento de receptores GluA2/3 no CPu, e esse aumento da expressão no primeiro mês ocorre apenas naqueles animais que foram induzidos ao modelo de DP, nos sugerindo que essa modificação no nível de GluA2/3 pode ocorrer em resposta à depleção dopaminérgica. No córtex motor, este aumento começa a ser observado a partir do segundo mês de exercício e da mesma forma que ocorre no CPu grande parte das alterações de GluA2/3 no córtex acontece em resposta a diminuição de dopamina e neurônios dopaminérgicos. Concomitante a estes resultados, observou-se que, especificamente após um mês de exercício, uma relação inversa à de GluA2/3 na expressão de GluA1 no CPu dos animais treinados. Esta redução de GluA1 pode favorecer a redução de hiperexcitabilidade cortical, uma vez que a presença de subunidades GluA1 nos receptores AMPA produz maior condutância de cátions devido a sua permeabilidade ao Ca^{2+} (PLANT et al., 2006). Estes resultados corroboram outro estudo em que animais submetidos ao modelo da DP por MPTP, que realizaram exercício por curto prazo (28 dias), revelaram aumento da expressão de GluA2. Além disso, esse estudo mostra que há um aumento do estado fosforilado de GluA2 na serina 880, a qual tem sido associada com um aumento do tráfego de receptores AMPA, e nenhum aumento na amplitude e frequência da corrente pós-sináptica excitatória (EPSC), o que sugere uma diminuição da excitabilidade glutamatérgica (VANLEEUEWEN et al., 2010). No nosso estudo, com a continuação do exercício durante alguns meses, observou-se que a expressão dos receptores AMPA sofrem várias outras alterações, tais como diminuição de GluA2/3 no CPu e aumento no CxM, além

de aumento de GluA1 nesta mesma região após três meses. No quarto mês de treinamento a expressão dos receptores AMPA parece mostrar níveis semelhantes aos de um mês de exercício. Estas oscilações de GluA2/3 parecem estar sincronizadas com as oscilações de proteína Arc. Quando observa-se, principalmente, o grupo de animais com DP exercitados por um mês, nota-se uma intensa redução da expressão Arc. Depois de três meses de treinamento, uma inversão clara dos níveis ocorre, e isto pode sugerir uma função homeostática do sistema. Tanto no CPu quanto no CxM a expressão de Arc parece ocorrer de forma crescente naqueles animais que não foram induzidos ao modelo de DP e fazem exercício físico, não sofrendo as oscilações vistas naqueles animais com depleção dopaminérgica. Logo, podemos sugerir que essas variações nos níveis de Arc parecem ocorrer como forma de compensar a depleção dopaminérgica. Estudos mostram que alterações na expressão do Arc são capazes de modificar o tráfego de receptores do tipo AMPA (CHOWDHURY et al., 2006; RIAL VERDE et al., 2006). Isto ocorre devido a ligação da proteína Arc com duas principais proteínas (endofilina 2/3 e dinamina), responsáveis pela regulação da cinética, distribuição espacial e indução de endocitose. Assim, altos níveis de Arc podem acelerar a internalização de receptores AMPA (principalmente GluA1 e GluA2), enquanto que níveis diminuídos ou a falta da expressão da proteína Arc retarda a endocitose (CHOWDHURY et al., 2006; RIAL VERDE et al., 2006). Por ser um gene de expressão imediata, Arc é regulada por atividade neuronal de forma dinâmica (RAO et al., 2006; STEWARD et al., 1998). No entanto, em modelos animais de DP, quando há um esgotamento dopaminérgico estriatal, parece que a proteína Arc tende a permanecer em uma quantidade reduzida devido às suas interações com receptores glutamatérgicos. Este equilíbrio homeostático entre Arc e receptores AMPA parece facilitar a plasticidade dependente de exercício através do controle homeostático dos níveis destes receptores na membrana, o que pode modular a excitabilidade neuronal.

5 CONCLUSÃO

Todos esses achados sugerem que essas alterações adaptativas na expressão de proteínas é um potencial mecanismo pelo qual o exercício pode conduzir neuroplasticidade dependente da experiência na DP. Esse reforço na neuroplasticidade através do exercício pode levar a mecanismos que compensem a alteração da disponibilidade dopaminérgica da DP a fim de retardar ou reverter a progressão da doença. Esperamos que nossos dados tragam informações que possam ajudar a identificar esses mecanismos compensatórios importantes para talvez modificar o curso da doença.

REFERÊNCIAS*

- AARSLAND, D. et al. Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson disease: an 8-year prospective study. **Arch Neurol.**, v. 60, n. 3, p. 387-392, Mar 2003.
- AIRAVAARA, M. et al. Neurorestoration. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 18 Suppl 1, p. S143-146, Jan 2012.
- AL-CHALABI, A.; MILLER, C. C. Neurofilaments and neurological disease. **Bioessays.**, v. 25, n. 4, p. 346-355, Apr 2003.
- AL-JARRAH, M. et al. Endurance exercise training promotes angiogenesis in the brain of chronic/progressive mouse model of Parkinson's Disease. **NeuroRehabilitation.**, v. 26, n. 4, p. 369-373, 2010.
- ALEXI, T. et al. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. **Prog Neurobiol.**, v. 60, n. 5, p. 409-470, Apr 2000.
- ALONSO-FRECH, F.; SANAHUJA, J. J.; RODRIGUEZ, A. M. Exercise and physical therapy in early management of Parkinson disease. **Neurologist.**, v. 17, n. 6 Suppl 1, p. S47-53, Nov 2011.
- ALT, A. et al. A role for AMPA receptors in mood disorders. **Biochem Pharmacol.**, v. 71, n. 9, p. 1273-1288, Apr 28 2006.
- ALVAREZ-FISCHER, D. et al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. **Exp Neurol.**, v. 210, n. 1, p. 182-193, Mar 2008.
- ARCHER, T. Physical exercise alleviates debilities of normal aging and Alzheimer's disease. **Acta Neurol Scand.**, v. 123, n. 4, p. 221-238, Apr 2011.
- ARIDA, R. M. et al. Exercise paradigms to study brain injury recovery in rodents. **Am J Phys Med Rehabil.**, v. 90, n. 6, p. 452-465, Jun 2011.
- BAILEY, C. H.; KANDEL, E. R. Structural changes accompanying memory storage. **Annu Rev Physiol.**, v. 55, p. 397-426, 1993.
- BASSO, M. et al. Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. **Proteomics.**, v. 4, n. 12, p. 3943-3952, Dec 2004.
- BELACHEW, S.; GALLO, V. Synaptic and extrasynaptic neurotransmitter receptors in glial precursors' quest for identity. **Glia.**, v. 48, n. 3, p. 185-196, Nov 15 2004.
- BETARBET, R.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays.**, v. 24, n. 4, p. 308-318, Apr 2002.
- BEZARD, E.; GROSS, C. E. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. **Prog Neurobiol.**, v. 55, n. 2, p. 93-116, Jun 1998.
- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS J.**, v. 279, n. 7, p. 1156-1166, Apr 2012.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 14 Suppl 2, p. S124-129, 2008.

BLANDINI, F. et al. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.**, v. 62, n. 1, p. 63-88, Sep 2000.

BLESA, J. et al. Classic and new animal models of Parkinson's disease. **J Biomed Biotechnol.**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

BLUM, D. et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.**, v. 65, n. 2, p. 135-172, Oct 2001.

BOWIE, D.; MAYER, M. L. Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. **Neuron.**, v. 15, n. 2, p. 453-462, Aug 1995.

BURCH, D.; SHEERIN, F. Parkinson's disease. **Lancet.**, v. 365, n. 9459, p. 622-627, Feb 12-18 2005.

CALABRESI, P. et al. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. **Trends Neurosci.**, v. 30, n. 5, p. 211-219, May 2007.

CALNE, D. B.; ZIGMOND, M. J. Compensatory mechanisms in degenerative neurologic diseases. Insights from parkinsonism. **Arch Neurol.**, v. 48, n. 4, p. 361-363, Apr 1991.

CHANG, P. K.; VERBICH, D.; MCKINNEY, R. A. AMPA receptors as drug targets in neurological disease--advantages, caveats, and future outlook. **Eur J Neurosci.**, v. 35, n. 12, p. 1908-1916, Jun 2012.

CHOWDHURY, S. et al. Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. **Neuron.**, v. 52, n. 3, p. 445-459, Nov 9 2006.

COHEN, A. D.; ZIGMOND, M. J.; SMITH, A. D. Effects of intrastriatal GDNF on the response of dopamine neurons to 6-hydroxydopamine: time course of protection and neurorestoration. **Brain Res.**, v. 1370, p. 80-88, Jan 25 2011.

COMERY, T. A.; SHAH, R.; GREENOUGH, W. T. Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expression. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 63, n. 3, p. 217-219, May 1995.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends Neurosci.**, v. 25, n. 6, p. 295-301, Jun 2002.

D'ANDREA, M. R.; ILYIN, S.; PLATA-SALAMAN, C. R. Abnormal patterns of microtubule-associated protein-2 (MAP-2) immunolabeling in neuronal nuclei and Lewy bodies in Parkinson's disease substantia nigra brain tissues. **Neurosci Lett.**, v. 306, n. 3, p. 137-140, Jun 29 2001.

DA SILVA, P. G. et al. Neurotrophic factors in Parkinson's disease are regulated by exercise: Evidence-based practice. **J Neurol Sci.**, v. 363, p. 5-15, Apr 15 2016.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron.**, v. 39, n. 6, p. 889-909, Sep 11 2003.

DAY, M. et al. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. **Nat Neurosci.**, v. 9, n. 2, p. 251-259, Feb 2006.

DELONG, M. Os Núcleos da Base. In: Kandel, E. (ed.) **Princípios da Neurociência**. Baureri, SP: Manole, 2003. p.853-867.

DERKSEN, M. J. et al. MAP2 and synaptophysin protein expression following motor learning suggests dynamic regulation and distinct alterations coinciding with synaptogenesis. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 87, n. 3, p. 404-415, Mar 2007.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp Neurol.**, v. 175, n. 2, p. 303-317, Jun 2002.

DINGLELINE, R. et al. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Ver.**, v. 51, n. 1, p. 7-61, Mar 1999.

DOMANSKYI, A.; SAARMA, M.; AIRAVAARA, M. Prospects of Neurotrophic Factors for Parkinson's Disease: Comparison of Protein and Gene Therapy. **Hum Gene Ther.**, v. 26, n. 8, p. 550-559, Aug 2015.

FELIX, J. V.; MICHELINI, L. C. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. **Hypertension.**, v. 50, n. 4, p. 780-785, Oct 2007.

FERREIRA, A. F. et al. Moderate exercise changes synaptic and cytoskeletal proteins in motor regions of the rat brain. **Brain Res.**, v. 1361, p. 31-42, Nov 18 2010.

FLEMING, J. J.; ENGLAND, P. M. AMPA receptors and synaptic plasticity: a chemist's perspective. **Nat Chem Biol.**, v. 6, n. 2, p. 89-97, Feb 2010.

FUJIMOTO, T. et al. Arc interacts with microtubules/microtubule-associated protein 2 and attenuates microtubule-associated protein 2 immunoreactivity in the dendrites. **J Neurosci Res.**, v. 76, n. 1, p. 51-63, Apr 1 2004.

GALVAN, A.; DEVERGNAS, A.; WICHMANN, T. Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. **Frontiers in Neuroanatomy.**, v. 9, p. 01-21, 2015.

GARCIA, P. C. et al. Different protocols of physical exercise produce different effects on synaptic and structural proteins in motor areas of the rat brain. **Brain Res.**, v. 1456, p. 36-48, May 25 2012.

GARDONI, F.; BELLONE, C. Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. **Front Cell Neurosci.**, v. 9, p. 1-11, 2015.

GOLBE, L. I. The genetics of Parkinson's disease: a reconsideration. **Neurology.**, v. 40, n. 10 Suppl 3, p. suppl 7-14; discussion 14-6, Oct 1990.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

GONZALEZ-BILLAULT, C. et al. Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. **J Neurosci Res.**, v. 67, n. 6, p. 713-719, Mar 15 2002.

GOTOW, T. Neurofilaments in health and disease. **Med Electron Microsc.**, v. 33, n. 4, p. 173-199, 2000.

GRIESBACH, G. S.; HOVDA, D. A.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. **Brain Res.**, v. 1288, p. 105-115, Sep 8 2009.

GUZOWSKI, J. F. et al. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. **J Neurosci.**, v. 20, n. 11, p. 3993-4001, Jun 1 2000.

HEGARTY, S. V.; O'KEEFFE, G. W.; SULLIVAN, A. M. Neurotrophic factors: from neurodevelopmental regulators to novel therapies for Parkinson's disease. **Neural Regen Res.**, v. 9, n. 19, p. 1708-1711, Oct 1 2014.

HERMAN, T. et al. Six weeks of intensive treadmill training improves gait and quality of life in patients with Parkinson's disease: a pilot study. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 88, n. 9, p. 1154-1158, Sep 2007.

HILL, W. D. et al. Neurofilament mRNA is reduced in Parkinson's disease substantia nigra pars compacta neurons. **J Comp Neurol.**, v. 329, n. 3, p. 328-336, Mar 15 1993.

HOFFMAN, P. N. et al. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 84, n. 10, p. 3472-3476, May 1987.

HOWELLS, D. W. et al. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. **Exp Neurol.**, v. 166, n. 1, p. 127-135, Nov 2000.

ISAAC, J. T.; ASHBY, M. C.; MCBAIN, C. J. The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. **Neuron.**, v. 54, n. 6, p. 859-871, Jun 21 2007.

JACKSON-LEWIS, V.; BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Animal models of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 18 Suppl 1, p. S183-185, Jan 2012.

KINTZ, N. et al. Exercise modifies alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor expression in striatopallidal neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse. **J Neurosci Res.**, v. 91, n. 11, p. 1492-1507, Nov 2013.

KLEIM, J. A.; COOPER, N. R.; VANDENBERG, P. M. Exercise induces angiogenesis but does not alter movement representations within rat motor cortex. **Brain Res.**, v. 934, n. 1, p. 1-6, Apr 26 2002.

KLINTSOVA, A. Y. et al. Altered expression of BDNF and its high-affinity receptor TrkB in response to complex motor learning and moderate exercise. **Brain Res.**, v. 1028, n. 1, p. 92-104, Nov 26 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

KORB, E.; FINKBEINER, S. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. **Trends Neurosci.**, v. 34, n. 11, p. 591-598, Nov 2011.

KREITZER, A. C.; MALENKA, R. C. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. **Neuron.**, v. 60, n. 4, p. 543-554, Nov 26 2008.

KUIPERS, S. D. et al. BDNF-induced LTP is associated with rapid Arc/Arg3.1-dependent enhancement in adult hippocampal neurogenesis. **Sci Rep.**, v. 6, p. 212-222, 2016.

LAU, Y. S. et al. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. **Eur J Neurosci.**, v. 33, n. 7, p. 1264-1274, Apr 2011.

LI, W.; KEIFER, J. BDNF-induced synaptic delivery of AMPAR subunits is differentially dependent on NMDA receptors and requires ERK. **Neurobiol Learn Mem.**, v. 91, n. 3, p. 243-249, Mar 2009.

LIU, Q. et al. Neurofilamentopathy in neurodegenerative diseases. **Open Neurol J.**, v. 5, p. 58-62, 2011.

MABANDLA, M. et al. Voluntary running provides neuroprotection in rats after 6-hydroxydopamine injection into the medial forebrain bundle. **Metab Brain Dis.**, v. 19, n. 1-2, p. 43-50, Jun 2004.

MANDELKOW, E.; MANDELKOW, E. M. Microtubules and microtubule-associated proteins. **Curr Opin Cell Biol.**, v. 7, n. 1, p. 72-81, Feb 1995.

MELROSE, H. L. et al. Impaired dopaminergic neurotransmission and microtubule-associated protein tau alterations in human LRRK2 transgenic mice. **Neurobiol Dis.**, v. 40, n. 3, p. 503-517, Dec 2010.

MIYAI, I. et al. Treadmill training with body weight support: its effect on Parkinson's disease. **Arch Phys Med Rehabil.**, v. 81, n. 7, p. 849-852, Jul 2000.

MORA, F.; SEGOVIA, G.; DEL ARCO, A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. **Brain Res Rev.**, v. 55, n. 1, p. 78-88, Aug 2007.

MURAMATSU, Y. et al. Cerebral alterations in a MPTP-mouse model of Parkinson's disease--an immunocytochemical study. **J Neural Transm (Vienna).**, v. 110, n. 10, p. 1129-1144, Oct 2003.

NANDHAGOPAL, R. et al. Longitudinal evolution of compensatory changes in striatal dopamine processing in Parkinson's disease. **Brain.**, v. 134, n. Pt 11, p. 3290-3298, Nov 2011.

OLANOW, C. W.; TATTON, W. G. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Annu Rev Neurosci.**, v. 22, p. 123-144, 1999.

PARK, H.; POO, M. M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. **Nat Rev Neurosci.**, v. 14, n. 1, p. 7-23, Jan 2013.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.**, v. 14, n. 2, p. 223-236, 2002.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. (Ed.). San Diego: Academic Press, 2005. 456 p.

PEREZ, C. A.; CANCELA CARRAL, J. M. Benefits of physical exercise for older adults with Alzheimer's disease. **Geriatr Nurs.**, v. 29, n. 6, p. 384-391, Nov-Dec 2008.

PERROT, R. et al. Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration. **Mol Neurobiol.**, v. 38, n. 1, p. 27-65, Aug 2008.

PETZINGER, G. M. et al. Exercise-enhanced neuroplasticity targeting motor and cognitive circuitry in Parkinson's disease. **Lancet Neurol.**, v. 12, n. 7, p. 716-726, Jul 2013.

PETZINGER, G. M. et al. Enhancing neuroplasticity in the basal ganglia: the role of exercise in Parkinson's disease. **Mov Disord.**, v. 25 Suppl 1, p. S141-5, 2010.

PETZINGER, G. M. et al. Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. **J Neurosci.**, v. 27, n. 20, p. 5291-5300, May 16 2007.

PINAUD, R. et al. Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment: implications for molecular plasticity. **Brain Res Mol Brain Res.**, v. 91, n. 1-2, p. 50-56, Jul 13 2001.

PLANT, K. et al. Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. **Nat Neurosci.**, v. 9, n. 5, p. 602-604, May 2006.

RADAK, Z. et al. Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis.**, v. 20, n. 3, p. 777-783, 2010.

RAO, V. R. et al. AMPA receptors regulate transcription of the plasticity-related immediate-early gene Arc. **Nat Neurosci.**, v. 9, n. 7, p. 887-895, Jul 2006.

REAL, C. C. et al. BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience.**, v. 237, p. 118-129, May 1 2013.

REAL, C. C. et al. Exercise-induced plasticity of AMPA-type glutamate receptor subunits in the rat brain. **Brain Res.**, v. 1363, p. 63-71, Dec 2 2010.

REAL, C. C. et al. Different protocols of treadmill exercise induce distinct neuroplastic effects in rat brain motor areas. **Brain Res.**, v. 1624, p. 188-198, Oct 22 2015.

RIAL VERDE, E. M. et al. Increased expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. **Neuron.**, v. 52, n. 3, p. 461-474, Nov 9 2006.

SACHS, C.; JONSSON, G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. **Biochem Pharmacol.**, v. 24, n. 1, p. 1-8, Jan 1 1975.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

SALGADO-DELGADO, R. et al. Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. **Neuroscience.**, v. 154, n. 3, p. 922-931, Jun 26 2008.

SANCHEZ, C.; DIAZ-NIDO, J.; AVILA, J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. **Prog Neurobiol.**, v. 61, n. 2, p. 133-168, Jun 2000.

SANS, N. et al. NMDA receptor trafficking through an interaction between PDZ proteins and the exocyst complex. **Nat Cell Biol.**, v. 5, n. 6, p. 520-530, Jun 2003.

SCHOBBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Res.**, v. 318, n. 1, p. 215-224, Oct 2004.

SEGOVIA, G. et al. Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective. **Mech Ageing Dev.**, v. 122, n. 1, p. 1-29, Jan 2001.

SHEPHERD, J. D. et al. Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. **Neuron.**, v. 52, n. 3, p. 475-484, Nov 9 2006.

SIEGEL, G. J.; CHAUHAN, N. B. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. **Brain Res Brain Res Rev.**, v. 33, n. 2-3, p. 199-227, Sep 2000.

SMITH, Y. et al. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. **Neuroscience.**, v. 86, n. 2, p. 353-387, Sep 1998.

SOMMER, B. et al. Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. **Science.**, v. 249, n. 4976, p. 1580-1585, Sep 28 1990.

STEWART, O. et al. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. **Neuron.**, v. 21, n. 4, p. 741-751, Oct 1998.

STOTT, S. R.; BARKER, R. A. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci.**, v. 39, n. 6, p. 1042-1056, Mar 2014.

SUNVISSON, H. et al. Changes in motor performance in persons with Parkinson's disease after exercise in a mountain area. **J Neurosci Nurs.**, v. 29, n. 4, p. 255-260, Aug 1997.

SZARO, B. G.; STRONG, M. J. Post-transcriptional control of neurofilaments: New roles in development, regeneration and neurodegenerative disease. **Trends Neurosci.**, v. 33, n. 1, p. 27-37, Jan 2010.

TAJIRI, N. et al. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. **Brain Res.**, v. 1310, p. 200-207, Jan 15 2010.

TANAKA, K.; OGAWA, N.; ASANUMA, M. Molecular basis of 6-hydroxydopamine-induced caspase activations due to increases in oxidative stress in the mouse striatum. **Neurosci Lett.**, v. 410, n. 2, p. 85-89, Dec 20 2006.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

TILLERSON, J. L. et al. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience.**, v. 119, n. 3, p. 899-911, 2003.

TOY, W. A. et al. Treadmill exercise reverses dendritic spine loss in direct and indirect striatal medium spiny neurons in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis.**, v. 63, p. 201-209, Mar 2014.

TUCKER, R. P.; GARNER, C. C.; MATUS, A. In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. **Neuron.**, v. 2, n. 3, p. 1245-1256, Mar 1989.

TUON, T. et al. Physical training exerts neuroprotective effects in the regulation of neurochemical factors in an animal model of Parkinson's disease. **Neuroscience.**, v. 227, p. 305-312, Dec 27 2012.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci.**, v. 2, n. 3, p. 266-70, Mar 1999.

VANLEEUEWEN, J. E. et al. Altered AMPA receptor expression with treadmill exercise in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. **J Neurosci Res.**, v. 88, n. 3, p. 650-668, Feb 15 2010.

WAUNG, M. W. et al. Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. **Neuron.**, v. 59, n. 1, p. 84-97, Jul 10 2008.

WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P. A. **Experimental and surgical technique in the rat.** (Ed.). San Diego: Academic Press, 1992. 382 p

WIRDEFELDT, K. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol.**, v. 26 Suppl 1, p. S1-5-8, Jun 2011.

WISDEN, W.; SEEBURG, P. H. Mammalian ionotropic glutamate receptors. **Curr Opin Neurobiol.**, v. 3, n. 3, p. 291-298, Jun 1993.

WRIGHT, A.; VISSEL, B. The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. **Front Mol Neurosci.**, v. 5, p. 1-13, 2012.

WU, S. Y. et al. Running exercise protects the substantia nigra dopaminergic neurons against inflammation-induced degeneration via the activation of BDNF signaling pathway. **Brain Behav Immun.**, v. 25, n. 1, p. 135-146, Jan 2011.

XU, Q. et al. Physical activities and future risk of Parkinson disease. **Neurology.**, v. 75, n. 4, p. 341-348, Jul 27 2010.

YIN, Y.; EDELMAN, G. M.; VANDERKLISH, P. W. The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneurosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 99, n. 4, p. 2368-2373, Feb 19 2002.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

YING, Z. et al. Exercise restores levels of neurotrophins and synaptic plasticity following spinal cord injury. **Exp Neurol.**, v. 193, n. 2, p. 411-419, Jun 2005.

YOON, M. C. et al. Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Neurosci Lett.**, v. 423, n. 1, p. 12-17, Aug 9 2007.

ZIGMOND, M. J. et al. Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. **Trends Neurosci.**, v. 13, n. 7, p. 290-296, Jul 1990.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.