CAROLLINY MOURA DA SILVA

**Autofagocitose e estresse oxidativo no sistema nervoso central de ratos
idosos submetidos ao exercício físico moderado**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de mestre em ciências.

Programa de fisiopatologia experimental

Orientadora: Profa. Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari

São Paulo

2015

CAROLLINY MOURA DA SILVA

**Autofagocitose e estresse oxidativo no sistema nervoso central de ratos
idosos submetidos ao exercício físico moderado**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de mestre em ciências.

Programa de fisiopatologia experimental

Orientadora: Profa. Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari

São Paulo

2015

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Merari de Fátima Ramires Ferrari pela oportunidade, orientação, e encorajamento durante as dificuldades encontradas durante o desenvolvimento do projeto.

Ao aluno Michael Fernandes de Almeida pela ajuda com os animais, experimentos e todo apoio durante todo o desenvolvimento desse estudo.

À Profa. Dra. Sandra Morais Cardoso por sua contribuição no desenvolvimento do projeto, pela dedicação, atenção e acolhimento na Universidade de Coimbra.

Aos professores: Luis Eduardo Soares Netto do Instituto de Biociências da USP, pela disponibilidade de espaço, equipamentos e contribuição em experimentos; Tânia Marcourakis da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e Marilene Demasi do Instituto Butantã pela ajuda no desenvolvimento de experimentos.

Aos colegas de laboratório pela colaboração.

Aos colegas de outros laboratórios em especial Raquel Esteves e Diana Silva da Universidade de Coimbra pela colaboração indispensável em meu estágio.

Ao programa de pós-graduação de Fisiopatologia Experimental pela oportunidade.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo à pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP

Processos: 2011/15283-2 (bolsa de mestrado – beneficiária: Carolliny Moura da Silva), 2013/08063-1 (Bolsa BEPE – beneficiária: Carolliny Moura da Silva), 2011/064347 (auxílio regular à pesquisa – responsável: Profª Merari F.R. Ferrari) e 2012/15495-2 (auxílio regular à pesquisa – responsável: Profª Merari F.R. Ferrari).

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Processos: 471779/2010-5 e 471999/2013-0 (Editais Universais – responsável: Profª Merari F.R. Ferrari)

NORMAS

Este texto está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: Apresentadas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com Listo of Journals Indexed in Index Medicus.

Estrutura textual: desenvolvida de acordo com o disposto em:

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por: Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Sumário

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Envelhecimento.....	1
1.2 Envelhecimento e Sistema nervoso central	2
1.2.1 Estresse oxidativo	3
1.2.2 Vias de degradação	5
1.3 Envelhecimento e exercício físico.....	9
1.4. Neurodegeneração.....	13
1.5. As doenças neurodegenerativas.....	16
1.5.1 As vias de degradação nas doenças neurodegenerativas.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivos gerais	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Animais.....	22
3.2. Exposição à rotenona	22
3.3. Protocolo de exercício físico em esteira	24
3.4. Coleta do material para análise.....	25
3.6. Análise das proteínas LC3-I, LC3-II e Beclina-1 por Western blot	28
3.5. Atividade do proteossomo.....	30
3.6. Níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	30
3.7. Atividade da Glutathione Peroxidase.....	31
3.8. Atividade da Glutathione Redutase.....	31
3.9. Análise da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	31
3.10. Análise dos resultados.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Hipocampo.....	33
4.1.1 Efeitos do tratamento com rotenona e do treinamento físico moderado após o tratamento nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.	33
4.1.2 Efeitos do treinamento físico moderado antes do tratamento com rotenona e da prática regular nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.	36

4.1.3 Efeitos da rotenona e do treinamento na atividade proteossomal e nos níveis de proteínas da via autofágica.	38
4.2. Substância Negra e Locus Coeruleus.....	41
4.2.1 Efeitos do tratamento e do treinamento físico moderado após o tratamento nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.....	41
4.2.2 Efeitos do treinamento físico moderado antes do tratamento com rotenona e da prática regular nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.	44
4.2.3 Efeitos da rotenona e do treinamento na atividade proteossomal e nos níveis de proteínas da via autofágica.	48
4.3. Córtex motor.....	51
4.3.1 Efeitos do tratamento e do treinamento nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.....	51
4.3.2 Efeitos do treinamento físico moderado antes do tratamento com rotenona e da prática regular nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.	53
4.3.3 Efeitos da rotenona e do treinamento na atividade proteossomal e nos níveis de proteínas da via autofágica.	55
4.4 Medula cervical, torácica e lombar.....	57
4.4.1 Efeitos do tratamento e do treinamento nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.....	57
4.3.2 Efeitos do treinamento físico moderado antes do tratamento com rotenona e da prática regular nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.	62
4.3.3 Efeitos do tratamento e dos diferentes tempos de treinamento físico moderado sobre a atividade proteossomal.	67
5. DISCUSSÃO.....	70
5.1 Hipocampo.....	70
5.1.1 O tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona altera parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.....	70
5.1.2 Treinamento físico moderado aplicado em diferentes tempos do tratamento com rotenona leva a resultados distintos.	72
5.1.3 O tratamento com rotenona aumenta os níveis de proteínas autofágicas em ratos idosos.....	76
5.1.4 Treinamento físico moderado diminui a atividade proteossomal quando aplicado antes e após o tratamento com rotenona. Nível das proteínas autofágicas permanece inalterado.	78
5.2 Substância negra e locus coeruleus.....	79
5.2.1 O tratamento com rotenona altera a atividade das enzimas Glutathione peroxidase e Glutathione redutase na substância negra.	79

5.2.2 Estresse oxidativo está alterado nos animais tratados com rotenona submetidos ao treinamento físico moderado aplicado regularmente e após o tratamento.....	81
5.2.3 O tratamento com rotenona aumenta a atividade do proteossomo e os níveis de LC3 II na substância negra de ratos idosos. A região do locus coeruleus demonstrou diminuição da atividade proteossomal.....	84
5.2.4 Treinamento físico moderado aplicado em diferentes tempos do tratamento com rotenona apresenta resultados distintos.	86
5.3 Córtex motor e medula espinhal.....	89
5.3.1 Neurônios motores são sensíveis ao tratamento com rotenona e sofrem alterações relacionadas ao estresse oxidativo.....	89
5.3.2 Diferentes protocolos de treinamento físico alteram parâmetros envolvidos no estresse oxidativo em neurônios motores.....	89
5.3.3 Regulação das vias de degradação em neurônios motores com o tratamento e diferentes tempos de aplicação do protocolo de treinamento.....	92
6. CONCLUSÕES	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
10. ANEXOS	112

RESUMO

O envelhecimento é um processo multifatorial caracterizado pela perda gradual e contínua da capacidade de realizar funções fisiológicas e de deflagrar respostas adaptativas, levando a prejuízos funcionais e estruturais dos diversos órgãos que compõem os diferentes sistemas, incluindo o sistema nervoso central. Nesse sentido, o exercício físico vem sendo amplamente especulado, pela capacidade de melhorar o funcionamento de diversos sistemas podendo amenizar os efeitos do envelhecimento, como a diminuição da via autofágica e o aumento do estresse oxidativo que colaboram para o início do processo neurodegenerativo. Desta forma, este estudo estabelece a relação entre diferentes protocolos de exercício físico aeróbico moderado em esteira (prática regular, prevenção e estabilização), a atividade proteossomal, o estado da autofagia celular e o nível de estresse oxidativo em ratos idosos na presença ou não de rotenona. Os resultados sugerem que o exercício aplicado após o tratamento com rotenona diminui os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no hipocampo, córtex motor e substância negra, acompanhado de um aumento na atividade da glutathione peroxidase (GPx) no hipocampo; diminui a atividade do proteossomo e não altera a via autofágica. O exercício antes do estímulo neurodegenerativo aumenta a atividade da GPx no hipocampo, córtex motor, locus coeruleus e medula cervical, bem como diminui a atividade do proteossomo no hipocampo, substância negra e locus coeruleus, e diminui os níveis de LC3II na substância negra. A prática regular demonstrou de uma forma geral que o exercício aumentou os níveis H_2O_2 em quase todas as áreas analisadas, exceto córtex motor e medula lombar, bem como diminuiu a atividade da GPx nas áreas encefálicas. Conclui-se que o exercício aplicado antes do tratamento com rotenona parece trazer maiores benefícios com relação aos parâmetros celulares analisados.

ABSTRACT

Aging is a multifactorial process characterized by gradual and continuous loss of ability to perform physiological functions and trigger adaptive responses leading to functional and structural damage of various organs that constitute the biological system, including the central nervous system. Exercise training has been widely speculated for its ability to improve physiological function, which ameliorate age-associated physiological impairments, such as decreased autophagy pathway and increased oxidative stress that collaborate with the neurodegenerative process. Thus, this study aims to establish the relationship between moderate aerobic exercise training protocols (regular practice, prevention and stabilization), proteasomal activity, autophagy and oxidative stress in aged rats, in the presence or absence of rotenone. Results suggest that exercise applied after rotenone exposure decreases the levels of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the hippocampus, motor cortex and substantia nigra, accompanied by an increase in glutathione peroxidase (GPx) activity in the hippocampus; decreases activity of the proteasome and does not alter autophagy. Exercise training applied before neurodegenerative stimulus increases GPx activity in hippocampus, motor cortex, locus coeruleus and cervical spinal cord; decreases proteasome activity in hippocampus, substantia nigra and locus coeruleus, as well as decreases LC3II levels in substantia nigra. Regular exercise practice promoted increase in H_2O_2 levels in almost all studied areas, except motor cortex and lumbar spinal cord, as well as reduced GPx activity in brain areas. In conclusion, results for the exercise applied before exposure to rotenone appear to have greater benefits regarding the analyzed cellular parameters.

1. INTRODUÇÃO

Avanços científicos e tecnológicos propiciam o aumento da expectativa de vida que é tendência mundial. Com isso, tem-se um número cada vez maior de idosos vivendo em todo o mundo. Tal fato implica no aparecimento de limitações e doenças ainda não bem compreendidas pela comunidade científica, trazendo assim grandes desafios.

1.1 Envelhecimento

O envelhecimento é um processo fisiológico contínuo e progressivo. Entretanto, as alterações presentes durante esse processo podem ser dependentes do envelhecimento primário ou secundário. O envelhecimento primário é geneticamente determinado, enquanto o secundário depende dos hábitos de cada indivíduo (BARRETO; NEGRÃO, 2010)

Considerando os aspectos envolvidos no envelhecimento secundário, pode-se dizer que a forma do envelhecimento é determinada pela velocidade do declínio das funções biológicas. Segundo a organização mundial de saúde, esse declínio é dependente dos hábitos individuais ao longo da vida, ou seja, alimentação, atividade física, exposição ao tabaco, consumo de álcool e exposição a agentes tóxicos (WHO, 2014)

Tais hábitos podem afetar fisiologicamente o organismo implicando em alterações celulares que desencadeiam desde aumento no estresse oxidativo (BOKOV; CHAUDHURI; RICHARDSON, 2004), até perda de massa muscular (CRUZ-JENTOFT et al., 2010), ou ainda levar ao desenvolvimento de doenças metabólicas como diabetes e hipertensão, e doenças neurodegenerativas

(FJELL et al., 2014; KOVACS et al., 2014; SALMON, 2012; SIERRA; LOPEZ-SOTO; COCA, 2008).

O declínio das funções biológicas durante o envelhecimento pode ser diretamente associado à probabilidade de desenvolver doenças de ordem psicológicas. Podemos considerar que um indivíduo que depende de outras pessoas para realizar simples tarefas do dia-a-dia tem maior probabilidade de desenvolver a depressão.

Além da dependência o envelhecimento traz outras implicações psicossociais, que são determinantes na vida do idoso. A queda na quantidade e qualidade da vida social são inevitáveis com o aumento da idade. Esse fator pode agravar fatores psicológicos e, somado ao declínio biológico, pode agravar ainda mais os problemas de saúde.

Entre as implicações de ordem psicológicas podemos considerar a depressão como uma das que mais acomete a população idosa. Nesse sentido, temos a depressão como um fator interdependente das doenças, sendo que há uma associação entre a depressão e consequente desenvolvimento de doenças, como por exemplo, a demência.

Assim, podemos concluir que o envelhecimento é um processo multifatorial, dependente de fatores genéticos e hábitos individuais. Os hábitos podem aumentar a susceptibilidade de desenvolver doenças e as implicações psicológicas aparecem como fator interdependente no agravamento de doenças como as neurodegenerativas.

1.2 Envelhecimento e Sistema nervoso central

O envelhecimento é um processo multifatorial caracterizado pela perda gradual e contínua da capacidade de realizar funções fisiológicas e de deflagrar

respostas adaptativas, levando a prejuízos funcionais e estruturais dos diversos órgãos que compõem os diferentes sistemas, incluindo o sistema nervoso central.

Durante o envelhecimento há formação natural de placas senis distribuídas por todo o sistema nervoso central. Estas placas, que são formadas por agregados proteicos, podem estar relacionadas à morte celular natural e ao comprometimento do organismo como o que ocorre na doença de Alzheimer (HARDY; SELKOE, 2002; SELKOE, 1989), Parkinson (GIBB; LEES, 1988), esclerose lateral amiotrófica (STRONG; KESAVAPANY; PANT, 2005; WATANABE et al., 2001), dentre outras.

Juntamente com o acúmulo dessas placas, já são observadas nesses indivíduos, algumas alterações celulares que podem agravar ainda mais os danos já presentes e levar à morte neuronal. A disfunção celular em decorrência da agregação de proteínas está relacionada, dentre outras coisas, ao prejuízo do tráfego de organelas e vesículas em geral (BENDISKE et al., 2002; CHURCHER, 2006; EBNETH et al., 1998).

Além disso, são comumente observadas alterações celulares relacionadas à mitocôndria e sistemas de degradação no sistema nervoso central senil.

1.2.1 Estresse oxidativo

O envelhecimento também leva a alterações na bioenergética mitocondrial, organela responsável pela produção de energia que é essencial para a sobrevivência celular. Com o envelhecimento há aumento na produção de espécies reativas de oxigênio no sistema nervoso central, o que precede a

agregação proteica e a perda neuronal, característica do encéfalo senil (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011).

Em um artigo de revisão, Lenaz (2000) constrói a teoria de que a idade é um fator importante para o aumento natural na quantidade de espécies reativas de oxigênio. Dessas, a espécie mais frequente é o peróxido de hidrogênio, o qual forma o radical hidroxila. Esse aumento de toxicidade leva a alterações aleatórias no DNA mitocondrial e assim inicia-se uma série de eventos que comprometem a homeostase mitocondrial.

Mecanismos de remoção dessas espécies também podem sofrer danos durante o envelhecimento, propiciando o desenvolvimento de um quadro neurodegenerativo. Entre os mecanismos que previnem o dano oxidativo pode-se citar a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) que removem ânions de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) do citoplasma, e glutathione peroxidase (GPx) que reduz H_2O_2 em água (H_2O) (DUMONT; BEAL, 2011; SQUIER, 2001; TURRENS, 2003). Esses mecanismos antioxidantes estão resumidos na figura 1.

As espécies reativas de oxigênio têm papel importante em vários processos fisiológicos e patológicos e o aumento dessas espécies, caracterizando aumento do estresse oxidativo, pode levar a danos celulares em macromoléculas e desencadear a morte celular (DROGE, 2002; STOIAN; OROS; MOLDOVEANU, 1996). Esses radicais são produtos da respiração mitocondrial, uma vez que o oxigênio serve como receptor de elétrons. Alterações em fatores metabólicos podem alterar a produção ou a remoção das espécies reativas de oxigênio, levando a um desbalanço na homeostase desse sistema (RIGOULET; YOBOUE; DEVIN, 2011; STARKOV, 2008).

Figura 1. Esquema representando o papel das enzimas antioxidantes na remoção de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de <http://www.intechopen.com>

Entretanto, apesar de fortes evidências a respeito da relação entre o envelhecimento e as espécies reativas de oxigênio e radicais livres, hoje já é discutível se o aumento dessas espécies reativas de oxigênio é realmente a causa do envelhecimento ou se são fatores que atuam na longevidade (LIOCHEV, 2013).

1.2.2 Vias de degradação

Os processos de degradação intracelular podem ocorrer por vias autofágicas e não-autofágicas. A via não autofágica compreende o sistema

proteossomal. Entre as funções desempenhadas por esse sistema estão: degradação de proteínas oxidadas, regulação do ciclo celular, o estresse, as respostas imunes e reparo do DNA. O sistema de degradação proteossomal pode ou não depender de ubiquitinação. As proteínas oxidadas estão diretamente relacionadas com a subunidade 20S do proteossoma, independente de poliubiquitinação, e parece ter relação direta com o estado redox celular (JUNG; CATALGOL; GRUNE, 2009; PICKERING; DAVIES, 2012; SHANG; TAYLOR, 2011).

Já a autofagia é dividida em macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas. A macro- e microautofagia envolvem o sequestramento de áreas inteiras do citosol por invaginações da membrana lisossomal e do retículo endoplasmático ou formando uma vesícula de dupla membrana os quais dão origem ao autofagossomo. A autofagocitose mediada por chaperonas é caracterizada pelo reconhecimento da carga por complexos de chaperonas citosólicas que levam essa carga até receptores específicos localizados na membrana dos lisossomos, neste tipo de autofagocitose a carga entra no lisossomo por um complexo translocador. Essas três formas de autofagia coexistem numa mesma célula, sendo que alterações nessas vias estão associadas a desordens neurodegenerativas (WONG; CUERVO, 2010).

A autofagia está relacionada a vários processos fisiológicos como a reciclagem de proteínas e organelas, resposta ao estresse, diferenciação celular, morte celular programada, dentre outros, bem como a condições patológicas (RAMI, 2009). É um mecanismo catabólico básico envolvido na degradação de componentes disfuncionais através da ação do lisossomo.

Deficiência nessa via tem demonstrado relação com o desenvolvimento de

diversas doenças (Papackova 2014).

Figura 2. Esquema ilustrando as etapas da autofagocitose e as proteínas envolvidas nesse processo. Adaptado de www.cellsignal.com.

Algumas proteínas envolvidas nessa via têm papel central na regulação. A sinalização inicial da autofagocitose envolve o complexo Ulk1/Beclina que gera as vesículas com dupla camada lipídica (TANIDA, 2010). A beclina-1 é

ortóloga da Atg6 de leveduras e tem papel central na programação da sobrevivência celular, sendo que sua disfunção pode implicar em desordens como câncer e neurodegeneração

Outra proteína importante nesse sistema é a LC3II que frequentemente é utilizada como marcador de autofagia. Durante a macroautofagia, os autofagossomos se fundem com o lisossomo resultando em um corpo autofágico no lúmen do compartimento degradativo. A proteína LC3, ortóloga da Atg8 de levedura, foi originalmente identificada como sendo uma proteína associada a microtúbulos, e também se associa de forma estável à membrana do autofagossomo. LC3I é citosólica e a LC3II é associada à membrana autofágica. A detecção da LC3I e LC3II é um marcador sensível para distinção e estudo do autofagossomo, sendo útil para monitorar o estado de autofagocitose, já que a conversão entre LC3I em LC3II correlaciona-se com o número de autofagossomos (RAMI, 2009).

Durante o envelhecimento, evidências crescentes indicam que há uma redução na taxa de formação de autofagossomos, maturação e da fusão desses com o lisossomo (HUA et al., 2014). Reforçando essa teoria, outro estudo relata que há relação entre estimulação da autofagia e o prolongamento de vida através do retardamento do envelhecimento (HE, L. Q.; LU; YUE, 2013).

Assim, pode-se concluir que a autofagia é um mecanismo importante durante o envelhecimento e que alterações nesta via podem determinar a qualidade celular do sistema nervoso central senil e acelerar o processo degenerativo.

1.3 Envelhecimento e exercício físico

O desenvolvimento de terapias que possam retardar o envelhecimento ou possibilitar que esse seja mais saudável tem sido alvo de pesquisas recentes. Nesse sentido, a prática de exercício físico tem sido relacionada com o prolongamento da expectativa de vida. Estudos mostram sua capacidade em melhorar o funcionamento de diversos sistemas fisiológicos, proporcionando melhor qualidade de vida e, com isso, aumento da longevidade.

As diretrizes do Colégio Americano de Medicina Esportiva (American College of Sports Medicine position stand. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness in healthy adults, 1990), estabelecem que um programa de exercício com frequência, intensidade e duração adequadas para cada indivíduo é capaz de melhorar sua aptidão cardiorrespiratória e muscular. Ainda, ressalta a importância do controle de cada variável para que se atinja o maior benefício com o menor risco. Em 2011, um posicionamento dado por esse mesmo órgão reforça a importância de se praticar exercício e seus benefícios para a manutenção de um estilo de vida saudável (GARBER et al., 2011)

Seguindo o mesmo raciocínio, diretrizes estabelecidas pelo departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos (Physical activity guidelines for Americans, 2008), apontam uma redução de 30% da mortalidade em indivíduos que praticam exercício físico. Tal número pode ser explicado, entre outros fatores, pela relação favorável entre a prática de atividade física, a função vascular e a aptidão cardiorrespiratória.

Além disso, diversos estudos já mostraram a capacidade do exercício em atuar de forma benéfica no tratamento de doenças como: obesidade, diabetes, hipertensão arterial, entre outras (DIMEO et al., 2012; FOCK; KHOO, 2013; MOE; AUGESTAD; NILSEN, 2013; RYNDERS et al., 2014). Existem diretrizes bem estabelecidas para cada doença, incluindo diretrizes brasileiras, que mostram a eficácia do exercício no controle dessas morbidades. Assim, os benefícios da prática de exercício físico parecem ser consistentes diante dos dados apresentados.

Considerando o envelhecimento populacional, a relação entre envelhecimento saudável e exercício é atualmente um dos temas alvo de pesquisas. Bherer e colaboradores (2013) demonstraram que o exercício físico é capaz de reduzir vários riscos associados à idade. Sabendo que um dos riscos associados à idade é a deficiência cognitiva, o exercício aeróbico, associado com um estilo de vida saudável, se mostra eficaz em retardar o aparecimento de danos cognitivos relacionados à idade (MORA, 2013). Ainda, além de evitar danos cognitivos, o exercício vem se mostrando eficiente em melhorar a plasticidade neuronal (ERICKSON; GILDENGERS; BUTTERS, 2013).

A relevância do estudo do envelhecimento pode ser demonstrada pela tendência de aumento da idade média da população. No Brasil, censo realizado pelo IBGE (2010) mostrou que o número de pessoas idosas deve passar de 7,4% para 26,7% até 2060. Ainda, a idade média da população deve passar de 75 para 81 anos dentro desse período. A ONU (2013) divulgou também que a média de idade da população mundial deve chegar aos 76 anos até 2050, atingindo 2,4 bilhões de pessoas idosas vivendo no mundo.

Acredita-se que cerca de 3% da população com mais de 60 anos sejam acometidas por doenças neurodegenerativas, número que pode duplicar progressivamente a cada avanço de cinco anos na idade (SCAZUFCA et al., 2002). De acordo com estudo populacional brasileiro, realizado com idosos numa comunidade de São Paulo, a prevalência de demência varia de 2%, entre os indivíduos com idade de 65 a 69 anos, a altíssimos 40% entre aqueles com idade superior a 84 anos (HERRERA; CARAMELLI; NITRINI, 1998)

Considerando o crescente potencial mundial de envelhecimento populacional, fica evidente a importância de estudos dos mecanismos que levam à neurodegeneração para a melhora da expectativa e qualidade de vida da população (MAYEUX, 2003).

Estudos do envelhecimento humano mostram que a prática de exercício físico protege contra o declínio cognitivo (SMITH et al., 2014). O exercício aumenta a atenção e o desempenho em tarefas cognitivas tanto em humanos quanto em outros primatas. Em modelo murino de acidente vascular cerebral, o exercício aeróbico promoveu ramificações dendríticas e aumento das habilidades motoras (PLOUGHMAN, 2008).

A prática de exercício físico pode atenuar os efeitos do envelhecimento sobre o sistema nervoso central por meio de alguns mecanismos já descritos, como: aumento da angiogênese e da saturação de oxigênio no sistema nervoso central (KRAMER et al., 1999); melhora da eficiência da neurotransmissão, como a serotonérgica e noradrenérgica, o que facilita o processamento da informação (KUBESCH et al., 2003; MCMORRIS et al., 2008) melhora do metabolismo (KINNI et al., 2011); diminuição da inflamação (COTMAN; BERCHTOLD; CHRISTIE, 2007) proteção contra a perda de

volume encefálico (ERICKSON et al., 2011) e aumento da expressão de neurotrofinas (PLOUGHMAN, 2008).

Em se tratando de exercício e sistema nervoso central, já foi descrito que o exercício é capaz de aumentar a síntese de dopamina, via calmodulina, através do aumento dos níveis de cálcio. Com isso o exercício é capaz de melhorar alguns sintomas relacionados à demência senil (SUTOO; AKIYAMA, 2003).

Carro e colaboradores (2001) demonstraram que exercício moderado (1km/dia) melhora a recuperação funcional e previne a morte de neurônios em diversos modelos murinos de injúria, como a degeneração hipocampal, injúria do tronco encefálico e degeneração cerebelar hereditária. Em animais que corriam antes de sofrerem a lesão apresentaram melhora da função neuronal, e aqueles que correram durante 5 semanas após a lesão, essa melhora alcançou 90% dos valores controles (PLOUGHMAN, 2008).

O exercício aeróbico moderado promoveu aumento de 14% da expectativa de vida de ratos modelos de ataxia cerebelar, bem como melhorou a habilidade motora e, ao exame histológico, observou-se aumento de 62% da sobrevivência das células de Purkinje nos corredores (UHLENDORF et al., 2011).

A intensidade do exercício físico deve ser considerada para que se obtenha efeitos benéficos ao sistema nervoso central. O exercício físico vigoroso pode amplificar a excitotoxicidade levando a aumento do incremento de cálcio intracelular em neurônios motores e subsequente morte celular. No entanto, protocolos de exercício físico de baixa a moderada intensidade são indicados em modelos murinos de esclerose lateral amiotrófica, enquanto

exercício de alta intensidade implica em efeitos deletérios em camundongos modelos de esclerose lateral amiotrófica genética (PATEL; HAMADEH, 2009).

Desta forma, os benefícios proporcionados pela prática regular do exercício físico em intensidades adequadas, parecem não só atuar na melhora do quadro das doenças neurodegenerativas, mas também amenizar os efeitos fisiológicos deletérios associados à idade.

1.4. Neurodegeneração

Ainda não é possível definir com precisão os fatores que iniciam o processo neurodegenerativo. Sabe-se apenas que alterações celulares relacionadas ao envelhecimento podem desencadear um processo progressivo e irreversível e que essas estão interligadas.

A principal função da mitocôndria é produzir energia para a célula. Entretanto, é também uma organela que protege a célula do estresse oxidativo, funcionando como um controle de qualidade celular. O aumento desse estresse é um dos fatores envolvidos precocemente na neurodegeneração e é capaz de prejudicar o sistema de controle de qualidade (MUKHERJEE; CHAKRABARTI, 2013). Assim, a mitocôndria fica mais vulnerável e os danos causados elevam os níveis de espécies reativas.

Alterações na produção de espécies reativas de oxigênio podem ocorrer por diversas razões. É bem descrito na literatura que durante o processo de neurodegeneração o estresse oxidativo está aumentado, sendo ânions de superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, característicos nas doenças neurodegenerativas (MELO, A. et al., 2011). Alterações no complexo I da cadeia respiratória são as principais responsáveis pela produção de

espécies reativas no organismo afetando a homeostase redox (FATO et al., 2009). A sobrevivência neuronal depende da integridade e funcionalidade das mitocôndrias (RUGARLI; LANGER, 2012). O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pode afetar, por exemplo, a produção de energia pela mitocôndria. Essa redução pode ser considerada um fator que afeta essa integridade e funcionalidade mitocondrial, uma vez que a principal função da mitocôndria é produzir energia na forma de ATP.

A produção de ATP também sofre alterações durante o envelhecimento, quando há deficiência dos complexos mitocondriais transportadores de elétrons, especialmente dos complexos I e III, resultando em redução na disponibilidade de energia para o neurônio. (ROMANO et al., 2013),.

Também são observadas alterações no controle de qualidade de proteína, dinâmica mitocondrial e vias de morte celular programada. Portanto, entender melhor a relação disfunção mitocondrial e neurodegeneração pode trazer melhor compreensão dos mecanismos desencadeadores de cada doença (KARBOWSKI; NEUTZNER, 2012).

Na neurodegeneração, danos também são observados no sistema de reciclagem e degradação (NIXON, 2006). Para manter o controle de qualidade das mitocôndrias, essas mitocôndrias não funcionais precisam passar por esse processo. Entretanto, o processo envolvido nesse reparo também se encontra comprometido (TAN et al., 2013).

A mitofagia, via de reciclagem e degradação das mitocôndrias, pode não funcionar de maneira eficiente por conta de uma série de alterações. Um dos fatores que impede que esse processo ocorra é a falta de energia, uma vez

que as vesículas contendo mitocôndrias para serem degradadas necessitam ser transportadas (PALIKARAS; TAVERNARAKIS, 2012).

O tráfego de organelas, assim como a mitocôndria, é outra via que se encontra alterada durante o início de um processo neurodegenerativo. Nesse sentido, estudo realizado por Melo e colaboradores (2013) mostrou que proteínas motoras envolvidas no transporte de organelas como a KIF1B e KIF5 encontram-se alteradas mesmo antes da agregação de proteínas.

O microtúbulo é a estrutura por onde as vesículas e organelas trafegam permitindo assim a comunicação entre corpo celular e terminal sináptico o qual também é essencial para sobrevivência neuronal (FRANKER; HOOGENRAAD, 2013). Sua desestabilização também é característica de um processo neurodegenerativo. Entre as principais causas da desestabilização está a hiperfosforilação da proteína Tau.

A tau é uma proteína associada ao microtúbulo. Quando hiperfosforilada sua função biológica é inibida (IQBAL et al., 2010). Essa hiperfosforilação pode acontecer independente da formação de beta amiloide e sua agregação prejudicando o transporte (ALONSO et al., 2006). Um dos fatores que pode levar à essa hiperfosforilação é o aumento do estresse oxidativo (REDDY, 2011).

A agregação de proteínas é um tema que vem sendo amplamente discutido na tentativa de relacionar a agregação com o início da doença. Alguns autores inclusive consideram que os eventos anteriores à agregação são mais tóxicos para a célula e levam à morte neuronal independente da agregação (ALONSO et al., 2006; ARRASATE et al., 2004; WAKABAYASHI et al., 2007).

1.5. As doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas mais incidentes no mundo hoje são Alzheimer e Parkinson. Elas podem ocorrer por uma causa familiar ou esporádica. A forma esporádica é a que compõe a maioria dos casos dessas doenças (EL KADMIRI et al., 2013). As causas celulares bem como a progressão das doenças neurodegenerativas são semelhantes.

A doença de Alzheimer é caracterizada pelo acúmulo de placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares. A doença é progressiva e irreversível onde ocorre uma perda gradual da memória (DE-PAULA et al., 2012). Entretanto, um diagnóstico conclusivo da doença só pode ser feito em pacientes post mortem (OCTAVE, 2005).

As placas neuríticas são compostas por proteína beta-amiloide produzida a partir da clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Diferentes processamentos da proteína precursora amiloide conferem a ela maior ou menor toxicidade. Já os emaranhados neurofibrilares são compostos por proteína tau hiperfosforilada associada ao microtúbulo (NATHALIE; JEAN-NOEL, 2008).

Estudos indicam que o acúmulo de beta-amiloide pode desencadear a hiperfosforilação da proteína tau (ZHENG, W. H. et al., 2002). O elo entre essas proteínas no entatanto parece ser a fosforilação, uma vez que as proteínas quinases que fosforilam a APP são capazes de fosforilar também a proteína tau no sistema nervoso central (NATHALIE; JEAN-NOEL, 2008).

A APP é uma proteína transmembranar que parece ter uma série de funções, entre elas podemos destacar regulação da homeostase e mediação

na neuroproteção (STOREY; CAPPAL, 1999). A clivagem feita pela gama secretase, parece ter papel fundamental no desenvolvimento de depósitos amiloides.

A doença de Parkinson é caracterizada pela perda de neurônios da substância negra contendo agregados de alfa sinucleína e corpos de Lewy (IRWIN; LEE; TROJANOWSKI, 2013). Os sintomas relacionados a essa doença são: sintomas motores, alterações cognitivas, alterações de comportamento e falhas no sistema nervoso autônomo (FRITSCH et al., 2012).

A alfa-sinucleína está envolvida, entre outras, com a integridade da membrana e tráfego, regula o tamanho das vesículas pré-sinápticas e participa da reciclagem de vesículas. Além disso, sabe-se que mutações ou aumento de alfa sinucleína podem causar Parkinson (EISBACH; OUTEIRO, 2013). Alguns mecanismos da doença mostram-se envolvidos com o aumento de alfa sinucleína, como prejuízos no tráfego e disfunção mitocondrial (EISBACH; OUTEIRO, 2013; LI et al., 2007).

Considerando que o agregado proteico é comum entre essas doenças, faz-se necessário um sistema capaz de degradar essas proteínas. Nesse sentido, as vias de degradação celular vêm sendo exploradas como alvo de terapias nas doenças neurodegenerativas.

1.5.1 As vias de degradação nas doenças neurodegenerativas

O déficit dos processos de degradação intracelular está associado à formação de agregados proteicos característicos das diversas doenças neurodegenerativas e do envelhecimento. Inclusive, foi demonstrado há tempos que as vias de degradação celular estão prejudicadas em pacientes

acometidos por neurodegeneração (NIXON, 2005). Mais recentemente, Heng e colaboradores (2010) descreveram o prejuízo precoce do sistema autofagocitário em camundongos modelos da doença de Huntington e sua possível implicação para a agregação de proteínas e prejuízo celular.

A deficiência na autofagia está associada a doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer, Huntington, Parkinson e demência lobar frontotemporal. As evidências são que o acúmulo de autofagossomos em encéfalos em degeneração está associado à progressão de doenças neurológicas, no entanto a relação exata da função autofágica da célula e o aparecimento e/ou manutenção do estado neurodegenerativo ainda precisa ser estudada (LEE, 2009).

Zheng e colaboradores (2010) mostraram que alterações lisossomais aparecem em estágios iniciais da degeneração axonal, sendo que a manutenção da função dessas organelas poderia ser importante para retardar a progressão de doenças neurodegenerativas. Mais recentemente, Ma e colaboradores (2011) demonstraram que ocorre aumento da atividade autofágica no início do envelhecimento em camundongos modelos de senescência, essa atividade autofágica então decresce com o avanço da idade culminando com as alterações celulares patológicas semelhantes às características da doença de Alzheimer esporádica.

Esses distúrbios nos processos de degradação intracelular podem contribuir para a deposição de proteínas no encéfalo (LAI et al., 2008). Além disso, há evidências de que o comprometimento do complexo autofagolisossomo está relacionado ao aparecimento de características da doença de Alzheimer em modelo experimental de neurodegeneração (NIXON,

2005). Distúrbios na macroautofagia resultam em disfunção sináptica e estresse celular (CHU et al., 2009) culminando em perda neuronal (UHLENDORF et al., 2011).

A ineficiência na degradação da proteína tau por autofagocitose pode promover agregação e acúmulo proteico, o que também prejudica o funcionamento dos lisossomos (BARRACHINA et al., 2006; WANG et al., 2009). Por outro lado, o estímulo da autofagia melhora a degradação de inclusões intracelulares protegendo a célula de seus efeitos tóxicos (RAVIKUMAR; SARKAR; RUBINSZTEIN, 2008).

Para ilustrar a importância da manutenção desse sistema, Cuervo e colaboradores (2010) demonstraram que a supressão basal da macroautofagia em cérebro de camundongos resultou em acúmulo de proteínas e neurodegeneração. Inclusive, esses mesmos autores demonstraram que a α -sinucleína pode prejudicar diretamente o sistema lisossomal (CUERVO et al., 2010).

Assim pode-se concluir que a deficiência em alguns sistemas celulares aparecem durante o processo de envelhecimento, continua m durante as doenças neurodegenerativas e contribuem para a progressão da doença. Portanto, estudar os possíveis efeitos do exercício físico sobre a autofagia celular durante o envelhecimento contribuirá para o entendimento das desordens neurodegenerativas em que há acúmulo de proteínas bem como para a proposição de medidas terapêutico-preventivas diferenciadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Estabelecer a relação entre o exercício aeróbico moderado em esteira, a atividade proteossomal, o estado da autofagia celular e o nível de estresse oxidativo em ratos idosos submetidos ou não ao exercício na esteira, na presença ou não de rotenona.

Comparar o efeito do exercício físico como prática regular, prevenção e estabilização dos níveis de estresse oxidativo, atividade proteossomal e/ou autofagia celular, por meio da exposição à rotenona.

2.2. Objetivos específicos

1) Avaliar o efeito do exercício físico moderado forçado na esteira sobre os níveis do estresse oxidativo no sistema nervoso central (medula espinhal, hipocampo, córtex motor, locus coeruleus e substância negra) de ratos idosos expostos a 1mg/kg/dia de rotenona, pela análise dos seguintes parâmetros:

- níveis de H₂O₂,
- atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e glutathione redutase,

2) Analisar a autofagia celular por meio da expressão das proteínas Beclina-1, LC3-II, por Western Blot, no hipocampo, córtex motor, locus coeruleus e substância negra de ratos idosos expostos a 1mg/kg/dia de rotenona e submetidos ou não ao exercício forçado na esteira, aplicado em diferentes tempos.

3) Estudar a influência do exercício físico em prevenir e/ou estabilizar o prejuízo celular (estresse oxidativo, disfunção do proteossoma e da autofagocitose) na medula espinhal, hipocampo, córtex motor, locus coeruleus

e substância negra, induzido pelo envelhecimento e exposição à rotenona em ratos idosos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Lewis, machos, com 8 ou 9 meses de idade, adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas e criados no departamento de genética e biologia evolutiva do Instituto de Biociências da USP. Esta linhagem foi escolhida por apresentar um envelhecimento precoce e ser suscetível à agregação de proteínas constitutivas após tratamento com rotenona.

Os experimentos propostos estão em conformidade com a lei federal nº 11.794, com todos os aspectos éticos de experimentação animal recomendados pelo CONCEA e foram aprovados no comitê de ética em experimentação animal do Instituto de Biociências, protocolo nº 137/2011 (onde o projeto foi realizado) e da Faculdade de Medicina, protocolo nº 452/11 (programa de pós-graduação a que o projeto está vinculado) ambas unidades da USP.

3.2. Exposição à rotenona

Os ratos foram submetidos ao tratamento crônico com rotenona (Sigma) administrada subcutaneamente por meio de mini bombas osmóticas (Alzet) durante 4 ou 8 semanas. As mini bombas foram implantadas por meio de uma pequena incisão na pele da região dorsal dos animais sob anestesia (cetamina e xilazina). A concentração de rotenona infundida foi de 1mg/kg/dia.

A rotenona é um pesticida natural e um inibidor específico do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, o que leva a mimetização do que ocorre

durante o processo de envelhecimento. O efeito da rotenona mais bem caracterizado é sobre o complexo I, mas também inibe o proteassomo, promove disfunção no GAPDH, age também sobre células gliais (CHOU et al., 2010; DUKES; KORWEK; HASTINGS, 2005; HUANG et al., 2009; SHERER et al., 2003), e atua diretamente sobre o citoesqueleto (CHOI; PALMITER; XIA, 2011).

Resultados prévios do laboratório demonstraram que o tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona não é capaz de causar a formação de agregados proteicos na região do Hipocampo, Substância Negra e Locus Coeruleus. Entretanto, foi demonstrado por Melo et al. (2012) que esta mesma concentração foi capaz de alterar a expressão de algumas proteínas motoras. Assim, a concentração utilizada é capaz de alterar a homeostase celular mas ainda não promove agregação proteica sendo interessante para o estudo das fases iniciais da neurodegeneração.

Ainda, nesse mesmo estudo foi demonstrado que não há alterações comportamentais nos ratos tratados com a dose de rotenona utilizada no presente estudo.

Os ratos envolvidos neste experimento tinham inicialmente 8 ou 9 meses de idade, pois é sabido que ratos idosos são mais sensíveis que jovens aos efeitos centrais da rotenona, apresentando maior formação de agregados proteicos insolúveis, sem que haja grandes efeitos periféricos decorrentes de intoxicação pela droga (PHINNEY et al., 2006), o que condiz com a fisiopatologia e etiologia das doenças neurodegenerativas.

As mini bombas osmóticas foram preparadas conforme recomendação do fabricante e em que foram cheias com solução de rotenona diluída em

DMSO e polietilenoglicol (1:1) de acordo com o peso de cada animal de forma a receberem a 1mg/kg/dia infundidos a uma velocidade de 2,5µL/hora. Os animais controles receberam solução de DMSO e polietilenoglicol (1:1) infundida através de mini bombas idênticas às dos animais do grupo experimental.

Os animais foram pesados antes da implantação das mini bombas e semanalmente até o final do protocolo experimental, com o intuito de identificar possíveis efeitos tóxicos exacerbados periféricos da rotenona e para assegurar o bem-estar animal. Não foram encontradas diferenças significativas.

3.3. Protocolo de exercício físico em esteira

O ciclo natural dos animais foi mantido, ou seja, o exercício foi aplicado no período noturno, onde há maior atividade, com início às 20h. Inicialmente todos os animais foram pré-selecionados de acordo com sua habilidade de correr na esteira, adaptada para animais, durante 15 sessões, em velocidades de 0,1 a 0,5 Km/h, duração de 10 a 30 minutos por dia, com 0% de inclinação.

Após o período de adaptação, os animais foram selecionados em dois grupos: sedentário e treinamento. Antes de iniciar o protocolo de treinamento todos realizaram o teste de capacidade máxima de exercício (teste de exercício gradativo na esteira iniciado a velocidade de 0,3 Km/h com incrementos de 0,3 Km/h a cada 3 minutos até a exaustão) para determinar a capacidade máxima individual e determinar as velocidades equivalentes ao protocolo de treinamento. O protocolo de treinamento foi adaptado de Amaral e colaboradores (2008) e consistiu em treinos de baixa intensidade, com velocidade de aproximadamente 50-60% da capacidade máxima individual,

durante 5 dias por semana, 40 minutos por dia, durante 6 ou 10 semanas de acordo com o protocolo experimental (Figura 3).

O teste de capacidade individual foi repetido a cada duas semanas, no grupo treinamento, para ajustes da velocidade diante do proposto pelo protocolo, e no final para permitir comparação com o teste inicial.

3.4. Coleta do material para análise

Após a finalização do protocolo de treinamento os animais foram eutanasiados por decapitação tendo o encéfalo e a medula espinhal retirados. Do encéfalo foram isoladas as seguintes áreas: córtex motor, hipocampo, substância negra e locus coeruleus. A medula espinhal foi dividida em 3 porções: de C3 a C5, compreendendo a porção cervical, de T6 a T8 compreendendo a porção torácica, de L2 a L4, compreendendo a porção lombar conforme a figura 4.

Figura 3. Esquema do protocolo e dos grupos experimentais treinamento físico forçado.

A **B** **C**

D

Figura 4. Imagens representativas de secções do encéfalo e áreas da medula de rato contendo as regiões extraídas para a análise. **(A)** córtex motor (CX) e hipocampo (HP); **(B)** substância negra (S.N.); **(C)** locus coeruleus (L.C.) e **(D)** medula cervical (M.C.), medula torácica (M.T.) e medula lombar (M.L.). Modificado de (BCRC; PAXINOS; WATSON, 2007).

3.6. Análise das proteínas LC3-I, LC3-II e Beclina-1 por Western blot

O tecido foi lisado e homogeneizado utilizando-se 400µL de tampão de lise constituído de NP40, deoxicolato de sódio, SDS, EDTA, EGTA e coquetel inibidor de proteases (Sigma). A quantidade de proteína foi acessada pelo método de Bradford (Bradford, 1976). A curva de calibração foi feita utilizando-se albumina em quantidade de 0 a 16 µg de proteína. As amostras foram armazenadas a -80°C. As amostras foram processadas em São Paulo e enviadas para o laboratório colaborador em Coimbra.

As amostras (30µg) foram desnaturadas à 100°C durante 5 minutos e aplicadas às canaletas do gel de poliacrilamida a 15% para fracionamento. Em uma das canaletas foi aplicado o marcador de peso molecular (Bio-Rad, EUA). O tampão de corrida foi preparado com trizma, glicina e SDS, as proteínas

foram separadas através de aplicação de 100 volts durante cerca de 20 minutos e logo depois 150 volts cerca de 40 minutos.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (previamente ativada) por 1 hora e 40 minutos a 0,75 amperes. Após a transferência a membrana foi bloqueada com BSA 5% em TBS-T durante 1 hora à temperatura ambiente, seguida de incubação overnight a 4°C com anti-LC3-I e anti-LC3-II (1:1.000; Cell Signaling Technology cod.3868).

A incubação da membrana com o anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina (anti-rabbit) (1:20.000, GE healthcare) foi feita à temperatura ambiente durante 1 hora. As membranas foram então lavadas e a marcação foi revelada pela incubação com reagente ECF (substrate for Western blotting, Amersham, GE healthcare) durante 5 minutos. A membrana foi visualizada no aparelho Versadoc (Bio-rad) conforme instruções do fabricante.

Em seguida, as membranas foram submetidas à nova marcação com anticorpo contra a beclina-1 (1:1.000; Cell Signaling Technology cod. 3738). A incubação também foi realizada overnight a 4°C, seguida de incubação do secundário (anti-rabbit) por 1 hora, reação e revelação como já descritos.

Para normalização, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário beta-actina (1:1.000; Santa Cruz cod SC-47778) durante a noite a 4°C, seguida de incubação com o anticorpo secundário (anti-mouse) (1:10.000), reação e revelação como já descrito. As imagens foram quantificadas pelo programa quantity one (bio-rad).

3.5. Atividade do proteossomo

A atividade do proteossomo foi determinada de acordo com o protocolo descrito por Silva e colaboradores (2012). Os tecidos foram lisados como descrito para a análise de Western Blot, entretanto não foi adicionado o coquetel inibidor de protease no tampão de lise.

Trinta microgramas de proteína foram incubadas com 125µM de substrato fluorogênico s-LLVY-AMC (Calbiochem) em 20 mM Tris / HCl, pH 7,5, a 37 ° C. Este substrato é amplamente utilizado para medir a atividade do proteossomo. Foi usado um peptídeo padrão para avaliar especificamente a atividade semelhante a quimotripsina do proteossomo, independente de ubiquitinação (HANNA et al., 2007). A emissão de fluorescência foi registrada a 440 nm (excitação a 365 nm) durante 45 minutos no fluorímetro Gemini XPS Fluorescence Microplate Reader.

3.6. Níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para avaliar os níveis de H₂O₂ intracelular uma modificação do método de Zhou e colaboradores (1997) foi empregado. Resumidamente, 30µg de extrato de proteína de tecidos do córtex motor, hipocampo, substância negra, locus coeruleus, medula cervical, torácica e lombar foram incubadas com 50µM do reagente fluorogênico Amplex red (Molecular Probes) e 1,0 U/mL de HRP diluído em 0,1 M de tampão fosfato, pH 7,0, a 37 ° C. A emissão de fluorescência foi registrada a 587 nm (excitação a 563 nm) durante 10 minutos no Gemini XPS Fluorescence Microplate Reader. Os níveis de peróxido de hidrogênio foram mostrados como porcentagem do controle.

3.7. Atividade da Glutathione Peroxidase

Atividade da glutathione peroxidase foi analisada de acordo com Flohe e Gunzler (1984). Foi realizada uma pré incubação por 5 minutos a 37°C de uma microplaca contendo: tampão de fosfato 0,1M, EDTA 1,0mM pH 7,0, GSH, GR e 80µg de proteína. Em seguida, Terc-butil foi utilizado como substrato, e a formação de glutathione oxidada (GSSG) foi indiretamente monitorada por espectrofotometria através do consumo NADPH detectado durante 5 minutos utilizando um comprimento de onda de 340nm.

3.8. Atividade da Glutathione Redutase

A atividade da Glutathione Redutase (GR) foi determinada de acordo com Carlberg e Mannervik (1975). Foram adicionados 80µg de proteína ao meio reacional contendo: Tampão de fosfato 0,1M mais EDTA 1,0 mM pH 7,0, EDTA 0,005M, água milliQ, GSSG e NADPH. A redução de GSSG em GSH foi mensurada através do consumo de NADPH, que foi monitorada por espectrofotometria por 5 minutos utilizando o comprimento de onda de 340nm a 37°C.

3.9. Análise da atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

A porcentagem de inibição da SOD foi determinada por um ensaio colorimétrico utilizando um Kit (AbCam-ab65354). Foram utilizados 10µg de proteína em cada poço, onde foi adicionado solução WST, tampão de diluição e enzima, sendo todas soluções do kit. Em seguida a placa foi incubada por 20 minutos a 37°C. A atividade da SOD foi mensurada indiretamente a partir da absorbância do produto da reação com a enzima xantina oxidase.

3.10. Análise dos resultados

Os resultados foram avaliados usando o programa GraphPad Prism (versão 4.03, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Sendo adotado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni, para avaliação da variação da massa corporal dos animais, análise da atividade do proteossoma, produção de H_2O_2 , atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e GR e níveis totais de glutathiona oxidada e reduzida.

4. RESULTADOS

4.1. Hipocampo

4.1.1 Efeitos do tratamento com rotenona e do treinamento físico moderado após o tratamento nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

Os resultados encontrados mostram que a rotenona sozinha não foi capaz de alterar os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na região do hipocampo (Figura 5A). Os resultados para atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD), mostram que o tratamento de 1mg/kg/dia, por si só, aumenta sua atividade o que pode ser demonstrado pela diminuição da porcentagem de inibição da enzima (Figura 5B).

Para as enzimas Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione Redutase (GR) os resultados mostram que o tratamento com rotenona, sozinho, aumenta a atividade tanto da GPx quanto da GR quando comparados com o controle DMSO (Figura 5C e D).

Considerando somente a ação do treinamento, não foi observada diferença significativa nos níveis de H_2O_2 entre os animais tratados apenas com DMSO (Figura 5A). O mesmo ocorre com a atividade da enzima antioxidante SOD, onde não se observa diferença significativa entre os animais tratados com DMSO (Figura 5B).

Figura 5 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , **A**), porcentagem de inibição da Superóxido Dismutase (SOD, **B**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **C**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **D**) no hipocampo de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado após o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) para os níveis de H_2O_2 , GPx e GR ou relativos (média $\pm$ desvio padrão) para a porcentagem de inibição da SOD. * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e [#] $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

Para a atividade das enzimas GPx e GR os resultados mostraram que houve aumento na atividade de ambas as enzimas quando os animais DMSO sedentários são comparados com os treinados (Figura 5C e D).

Entretanto, os resultados encontrados para os animais treinados após o tratamento com rotenona mostram redução significativa dos níveis de H_2O_2 . Tal diferença é significativa tanto quando comparados aos animais expostos ao DMSO quanto comparados com os animais sedentários tratados com rotenona (Figura 5A).

A porcentagem de inibição da SOD é menor no hipocampo dos ratos expostos à rotenona sedentários quando comparados com o DMSO sedentário, entretanto a atividade da SOD está reduzida (demonstrado pela maior porcentagem de inibição) nos animais expostos à rotenona e que praticaram atividade física após o tratamento tanto quando comparado com o tratado sedentário quanto comparado com o treinado DMSO (Figura 5B).

Analizando ainda o mesmo grupo, nos resultados para as enzimas GPx e GR é possível observar respostas diferentes para cada uma das enzimas: Para GPx a atividade aumenta quando comparada ao seu controle DMSO e diminui quando comparada ao tratado sedentário; A GR apresenta uma diminuição quando comparada com o controle DMSO e se mantém sem diferença significativa quando comparada ao tratado sedentário (Figura 5C e D).

Em suma, o tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona foi capaz de alterar a atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e GR. O exercício por si só altera somente a atividade da GPx e GR. Já o exercício nos animais tratados com rotenona, além de demonstrar alterações nas enzimas antioxidantes, reduziu os níveis de H_2O_2 .

4.1.2 Efeitos do treinamento físico moderado antes do tratamento com rotenona e da prática regular nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

Os resultados encontrados para os parâmetros envolvidos no estresse oxidativo, na região do hipocampo, mostram que não há alterações nos níveis de H_2O_2 nos animais submetidos ao treinamento antes do tratamento com rotenona (Figura 6A).

Observando os resultados para as enzimas antioxidantes GPx e GR encontra-se que os animais submetidos ao treinamento antes do tratamento com rotenona apresentaram diminuição significativa somente para a atividade da GR (Figura 6B e C).

Considerando os animais controles, tratados com DMSO, e submetidos ao treinamento antes, durante e depois do tratamento (prática regular) observa-se que não foi encontrada diferença significativa nos níveis de H_2O_2 quando comparados aos animais DMSO submetidos ao treinamento antes (Figura 6A).

Para as enzimas GPx e GR foi verificado aumento significativo somente para a enzima GR, quando comparados aos animais DMSO submetidos ao treinamento antes do tratamento (Figura 6C e D).

Para o grupo tratado com 1mg/kg/dia de rotenona e submetido ao treinamento físico regular, foi observado aumento significativo nos níveis de H_2O_2 relativo aos animais treinados antes do tratamento (Figura 6A). Houve redução da atividade da GPx quando comparados com o grupo submetido ao treinamento antes do tratamento com rotenona, e diminuição da enzima GR relativo ao controle DMSO submetido ao mesmo treinamento (Figura 6B e C).

Figura 6 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, **A**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **B**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **C**) no hipocampo de ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes do tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes, durante e depois o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário). * p≤0,05 em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e [#] p≤0,05 em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

Em resumo, a única alteração encontrada nos animais treinados antes do tratamento com rotenona foi a atividade da GR, assim como para o grupo DMSO treinado regularmente. Já os animais treinados regularmente e tratados com rotenona apresentaram aumento nos níveis de H₂O₂ e alterações tanto na GPx quanto na GR.

4.1.3 Efeitos da rotenona e do treinamento na atividade proteossomal e nos níveis de proteínas da via autofágica.

Os sistemas de degradação também foram analisados no hipocampo pela atividade do proteossomo e níveis de Beclina-1 e LC3-II, as quais são duas proteínas envolvidas na via autofágica.

O tratamento com rotenona não alterou a atividade do proteossomo no hipocampo. Entretanto, observa-se aumento significativo nos níveis de beclina-1 e LC3 II (Figura 7A, C e D).

Considerando o protocolo de treinamento após o tratamento pode-se observar redução da atividade proteossomal nos animais controles DMSO, enquanto na via autofágica observa-se aumento tanto nos níveis de beclina-1 quanto nos níveis de LC3 II quando comparados ao grupo DMSO sedentário (Figura 7A, C e D).

Para os animais tratados com rotenona e submetidos ao treinamento após, verificamos que a atividade proteossomal está significativamente diminuída tanto em relação ao seu controle DMSO quanto em relação ao rotenona sedentário. Para o mesmo grupo não foram encontradas alterações nos níveis das proteínas envolvidas na via autofágica (Figura 7A, C e D).

Em relação ao grupo submetido ao treinamento antes do tratamento foi possível comparar os animais DMSO com o controle DMSO sedentário somente os níveis de beclina-1 e LC3 II por conta de limitações metodológicas. Nesse sentido, tanto os níveis de beclina-1 quanto de LC3 II aumentam significativamente com o protocolo de treinamento antes (Figura 7B, C e D).

Já os animais submetidos ao treinamento antes do tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona mostraram redução da atividade proteossomal quando

comparado ao controle DMSO e não apresentaram alterações nos níveis das proteínas beclina-1 e LC3 II. Tal resultado se assemelha às respostas encontradas para o grupo tratado com rotenona e submetido ao treinamento após o tratamento (Figura 7B, C e D).

Os resultados encontrados para a prática regular do exercício não demonstraram alterações significativas em nenhum dos parâmetros analisados no hipocampo. A atividade proteossomal permaneceu inalterada tanto no DMSO quanto nos tratados, assim como os níveis de beclina-1 e LC3 II em ambos (Figura 7B, C e D).

Em suma, o tratamento com rotenona aumenta os níveis de beclina-1 e LC3 II. O treinamento após o tratamento nos animais DMSO diminui a atividade proteossomal e aumenta os níveis de beclina-1 e LC3 II e nos animais tratados com rotenona só reduz a atividade proteossomal. O treinamento aplicado antes do tratamento elevou os níveis de beclina-1 e LC3 II nos animais DMSO

Figura 7 – Atividade do proteossomo (**A,B**), níveis de Beclina-1 (**C**) e LC3II (**D**) no hipocampo de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e submetidos a diferentes protocolos de exercício físico moderado. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) $\pm$ desvio padrão nos grupos: sedentário, exercício após tratamento com rotenona, exercício antes do tratamento com rotenona e prática regular (antes, durante e depois do tratamento com rotenona). * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

4.2. Substância Negra e Locus Coeruleus

4.2.1 Efeitos do tratamento e do treinamento físico moderado após o tratamento nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo

O tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona não alterou os níveis de H_2O_2 na substância negra e locus coeruleus (Figura 8A e 9A). Considerando somente o tratamento também nas duas áreas analisadas não foi encontrada diferença significativa para o percentual de inibição da enzima antioxidante SOD (Figura 8B e 9B).

Ainda observando os resultados encontrados para os animais sedentários tratados com rotenona, encontramos que a atividade da enzima GPx encontra-se aumentada significativamente na substância negra e a atividade da enzima GR na mesma região está diminuída (Figura 8C e D). Por limitações metodológicas não foi possível chegar a resultados conclusivos para as mesmas enzimas na região do locus coeruleus.

Para os animais DMSO submetidos ao protocolo de treinamento após o tratamento também não foi encontrada diferença significativa nos níveis de H_2O_2 nessas duas áreas analisadas (Figura 8A e 9A)..

Ainda considerando os animais DMSO submetidos ao exercício após o tratamento, os resultados encontrados para percentual de inibição da enzima SOD não apresenta diferença significativa em ambas as regiões, substância negra e locus coeruleus (Figura 8B e 9B).

Como citado anteriormente, por limitações metodológicas foi possível analisar a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR somente na substância negra. Assim, os resultados para o grupo DMSO treinado após o tratamento, podemos observar alterações somente na atividade da enzima GR,

que mostrou redução da atividade comparada ao DMSO sedentário (Figura 8C e D).

Já os animais tratados com rotenona e submetidos ao mesmo protocolo de treinamento apresentam redução nos níveis de H_2O_2 , tanto em relação ao rotenona sedentário quanto em relação ao controle DMSO, na substância negra. No locus coeruleus não foi encontrada diferença significativa (Figura 8A e 9A).

Analizando ainda o mesmo grupo, encontra-se maior ativação da SOD tanto na substância negra quanto no locus coeruleus relativos ao percentual de ativação do rotenona sedentário. Ainda no locus coeruleus essa ativação é maior quando comparada com o controle DMSO treinado (Figura 8B e 9B).

Os resultados para GPx e GR no grupo tratado com rotenona e submetido ao treinamento após o tratamento mostram que em relação ao controle DMSO, só a enzima GR apresentou alteração, sendo esta um aumento. Relativo ao tratado sedentário a GPx apresentou redução, enquanto a GR mostrou aumento (Figura 8C e D).

Em resumo, o tratamento altera somente as enzimas antioxidantes GPx e GR nos animais tratados com rotenona na região da substância negra. Para os animais tratados com rotenona e submetidos ao treinamento após o tratamento todos os parâmetros analisados encontram-se alterados na região da substância negra. São estes: diminuição dos níveis de H_2O_2 , maior ativação da SOD, diminuição da GPx e aumento da GR.

Figura 8 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, **A**), porcentagem de inibição da Superóxido Dismutase (SOD, **B**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **C**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **D**) na Substância Negra de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado após o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) para os níveis de H₂O₂, GPx e GR ou relativos (média ± desvio padrão) para a porcentagem de inibição da SOD. * p≤0,05 em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e [#] p≤0,05 em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

Figura 9 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, **A**) e porcentagem de inibição da Superóxido Dismutase (SOD, **B**), no locus coeruleus de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado após o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) para os níveis de H₂O₂ ou relativos (média $\pm$ desvio padrão) para a porcentagem de inibição da SOD. * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e [#] $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

4.2.2 Efeitos do treinamento físico moderado antes do tratamento com rotenona e da prática regular nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

O tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona nos animais que foram submetidos ao exercício antes não alterou os níveis de H₂O₂ na substância negra e no locus coeruleus (Figura 10A e 11A).

Para a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR, foi encontrado que o tratamento nos animais submetidos ao treinamento antes apresentou alterações diferentes para cada uma das regiões. Na substância negra os animais tratados com rotenona mostraram alterações somente na enzima GR,

sendo esta alteração uma redução em relação ao seu controle DMSO. No locus coeruleus tanto a GPx quanto a GR mostraram alterações. Ambas as enzimas aumentaram sua atividade relativa ao seu controle DMSO (Figura 10B e C e 11B e C).

Considerando os animais DMSO que treinaram antes, durante e depois do tratamento os níveis de H_2O_2 permaneceram sem diferenças significativas tanto na substância negra quanto no locus coeruleus (Figura 10A e 11A). Nesse mesmo grupo a atividade das enzimas antioxidantes GPX e GR apresentaram resultados distintos.

Na substância negra o grupo DMSO treinado regularmente mostrou aumento significativo somente para a enzima GR relativo ao DMSO treinado antes (Figura 10B e C). No locus coeruleus tanto a GPx quanto a GR mostraram aumento relativo ao DMSO treinado antes (Figura 11B e C).

O grupo tratado com 1mg/kg/dia de rotenona e treinado regularmente, (antes, durante e depois do tratamento) apresentou aumento nos níveis de H_2O_2 em ambas as áreas analisadas. Esse aumento é significativamente maior tanto em relação ao seu controle DMSO quanto em relação ao rotenona treinado antes do tratamento (Figura 10A e 11A).

A atividade da enzima GPx na substância negra não apresenta diferença significativa no grupo treinado regularmente, enquanto a enzima GR apresenta uma redução relativa ao controle DMSO e aumento relativo ao rotenona treinado antes do tratamento (Figura 10B e C).

Na região do locus coeruleus o grupo tratado com rotenona e treinado regularmente apresentou redução significativa da atividade da GPx quando comparado ao controle DMSO. A GR também apresentou redução significativa

no grupo tratado com rotenona e submetido à prática regular de exercício quando comparado ao controle DMSO e ao rotenona treinado antes do tratamento (Figura 11B e C).

Em suma, somente a prática regular do exercício aumentou os níveis de H_2O_2 nos animais tratados, tanto na substância negra quanto no locus coeruleus. Há variações distintas para GPx e GR.

Figura 10 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , **A**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **B**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **C**) na substância negra de ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes do tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes, durante e depois o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário). * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma

condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

Figura 11 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, **A**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **B**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **C**) no locus coeruleus de ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes do tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes, durante e depois o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário). * p≤0,05 em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # p≤0,05 em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

4.2.3 Efeitos da rotenona e do treinamento na atividade proteossomal e nos níveis de proteínas da via autofágica.

A atividade proteossomal aumentou na substância negra e diminuiu no locus coeruleus de ratos sedentários expostos a 1mg/kg/dia de rotenona (Figuras 12A e 13A). Os níveis de beclina-1 não se alteraram significativamente nessas regiões, enquanto a LC3 II aumentou somente na substância negra (Figura 12C e D e 13C e D).

Os resultados para o grupo DMSO treinado após o tratamento indicam diminuição da atividade proteossomal quando comparado ao DMSO sedentário na substância negra e locus coeruleus (Figura 12A e 13A). Nesse mesmo grupo os níveis de proteína beclina-1 não se alteram significativamente em nenhuma das duas regiões e os níveis de LC3 II mostrou aumento somente na substância negra (Figura 12C e D, 13C e D).

Os animais treinados após o tratamento com rotenona mostraram também uma diminuição da atividade proteossomal nas duas regiões quando comparado com o rotenona sedentário, sendo a atividade semelhante ao controle DMSO treinado (Figura 12A e 13A). Ainda, esses animais tratados com rotenona e treinados após, não apresentaram diferença nos níveis das proteínas envolvidas na via autofágica tanto na substância negra quanto no locus coeruleus (Figura 12C e D e 13C e D).

Por limitações metodológicas, com relação à atividade do proteossomo, os animais treinados antes do tratamento só podem ser comparados com os animais submetidos à prática regular, mas todos os grupos podem ser comparados entre si na análise dos níveis de beclina-1 e LC3 II. Esta análise mostrou aumento significativo, na substância negra, tanto nos níveis de

beclina-1 quanto de LC3 II no grupo DMSO que treinado (Figura 12C e D). Não há diferenças significativas no locus coeruleus (Figura 13C e D).

O grupo treinado antes de receber o tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona apresentou redução na atividade proteossomal tanto na substância negra quanto no locus coeruleus (Figura 12B e 13B).

Figura 12 – Atividade do proteossomo (A,B), níveis de Beclina-1 (C) e LC3II (D) na substância negra de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e submetidos a diferentes protocolos de exercício físico moderado. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) $\pm$ desvio padrão nos grupos: sedentário, exercício após tratamento com rotenona (G1), exercício antes do tratamento com rotenona (G2) e prática regular (G3; antes, durante e depois do tratamento com rotenona). * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

Os níveis de beclina-1 permaneceram inalterados, nas duas regiões, para os animais treinados antes de receber o tratamento. Já os níveis de LC3 II mostram diferença só na substância negra, sendo os níveis de LC3 II reduzidos quando comparados ao rotenona sedentário (Figura 12C e D, 13C e D).

A atividade do proteossomo para os animais DMSO treinados regularmente não se alterou em nenhuma das duas áreas analisadas (Figura 12B e 13B). Os níveis das proteínas envolvidas na via autofágica não apresentam muitas alterações. Diferença significativa é observada somente nos níveis de beclina-1 na substância negra, sendo essa diferença um aumento relativo ao DMSO sedentário (Figura 12C e D, 13C e D).

O treinamento regular nos animais tratados com rotenona promoveu aumento na atividade proteossomal quando comparado com seu respectivo controle DMSO somente na região do locus coeruleus (Figura 13B).

Os níveis de beclina-1 diminuíram na substância negra para os animais tratados com rotenona quando comparados ao seu controle DMSO. Não há alterações nos níveis de LC3 II em nenhuma das duas áreas (Figura 12C e D, 13C e D).

Resumindo, o tratamento com rotenona aumentou a atividade proteossomal e os níveis de LC3 II na substância negra e diminuiu atividade proteossomal no locus coeruleus. Para o grupo treinado após o tratamento só há redução na atividade proteossomal em ambas as áreas. O treinamento realizado antes do tratamento diminuiu atividade proteossomal tanto na substância negra quanto no locus coeruleus, e diminuiu os níveis de LC3 II na substância negra.

Figura 13 – Atividade do proteossomo (**A,B**), níveis de Beclina-1 (**C**) e LC3II (**D**) no locus coeruleus de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e submetidos a diferentes protocolos de exercício físico moderado. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) $\pm$ desvio padrão nos grupos: sedentário, exercício após tratamento com rotenona (G1), exercício antes do tratamento com rotenona (G2) e prática regular (G3; antes, durante e depois do tratamento com rotenona). * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

4.3. Córtex motor

4.3.1 Efeitos do tratamento e do treinamento nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

O tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona não alterou os níveis de H_2O_2 no córtex motor de ratos idosos (Figura 14A). Entretanto, a porcentagem de inibição da SOD foi menor nos animais sedentários tratados com rotenona

(Figura 14B). Por limitações metodológicas não foi possível analisar a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR na região do córtex motor.

Figura 14 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , **A**) e porcentagem de inibição da Superóxido Dismutase (SOD, **B**) no córtex motor de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado após o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) para os níveis de H_2O_2 ou relativos (média $\pm$ desvio padrão) para a porcentagem de inibição da SOD. * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

Analisando os resultados encontrados para os animais DMSO submetidos ao treinamento físico moderado após o tratamento podemos observar que não houve alterações tanto nos níveis de H_2O_2 quanto na porcentagem de inibição da SOD (Figura 14A e B).

Já os resultados para os animais tratados com rotenona e submetidos ao treinamento físico após o tratamento mostram redução nos níveis de H_2O_2 tanto quando comparados com o controle DMSO quanto quando comparado com rotenona sedentário (Figura 14A).

Para a análise de porcentagem de inibição da SOD verifica-se que há um aumento de ativação relativo ao controle DMSO e inibição quando comparado com o rotenona sedentário (Figura 14B).

Em suma, há aumento da ativação da SOD para os animais tratados com rotenona. Para os animais treinados após o tratamento há redução nos níveis de H_2O_2 e maior ativação da SOD.

4.3.2 Efeitos do treinamento físico moderado antes do tratamento com rotenona e da prática regular nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

As análises realizadas para os níveis de H_2O_2 nos animais submetidos ao treinamento físico moderado antes do tratamento com rotenona não mostraram alterações (Figura 15A). Nesse sentido, a atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR também não apresentaram alterações quando comparados com seus respectivos controles DMSO (Figura 15B e C).

O grupo DMSO treinado regularmente não apresentou alterações nos níveis de H_2O_2 e atividade da enzima GPx (Figura 15A e B). Entretanto, o mesmo grupo apresentou aumento na atividade da GR quando comparado com o grupo DMSO treinado antes do tratamento (Figura 15C).

Finalmente, para os animais tratados com rotenona e treinados regularmente foi observado aumento dos níveis de H_2O_2 relativos ao grupo rotenona treinado antes do tratamento (Figura 15A). Não foi observado diferença na atividade da enzima GPx e houve um aumento na atividade da GR também relativo ao rotenona treinado antes do tratamento (Figura 15B e C).

Em resumo, só há aumento nos níveis de H_2O_2 para os animais tratados e treinados regularmente, bem como aumento na atividade da GR.

Figura 15 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , **A**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **B**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **C**) no córtex motor de ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes do tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes, durante e depois o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário). * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

4.3.3 Efeitos da rotenona e do treinamento na atividade proteossomal e nos níveis de proteínas da via autofágica.

Os resultados mostraram que o tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona não foi capaz de alterar a atividade proteossomal no córtex motor (Figura 16A). Já a beclina-1 mostrou-se aumentada após tratamento com rotenona , enquanto os níveis de LC3 II permaneceram inalterados (Figura 16C e D).

Considerando os resultados encontrados para o treinamento aplicado após o tratamento nos animais DMSO, pode-se perceber que o exercício só foi capaz de aumentar os níveis de LC3 II (Figura 16A, C e D).

Já nos animais tratados com rotenona e submetidos ao mesmo protocolo de treinamento, pode-se observar que não houve alteração em nenhum dos resultados analisados (Figura 16A, C e D).

Mais uma vez, por limitações metodológicas a análise dos animais DMSO treinados antes do tratamento só foi possível para os níveis de proteína beclina-1 e LC3 II. Essas análises demonstraram que o treinamento aplicado antes do tratamento só alterou os níveis de beclina-1, sendo essa alteração caracterizada por um aumento significativo dos níveis (Figura 16C e D).

Assim como ocorreu no grupo treinado após o tratamento, o grupo tratado com rotenona submetido ao treinamento antes do tratamento, também não demonstrou diferença significativa em nenhum dos parâmetros analisados (Figura 16B, C e D).

Nas análises realizadas para os animais DMSO submetidos ao treinamento regular podemos observar que somente os níveis de LC3 II mostraram aumento significativo. Os outros parâmetros permaneceram

inalterados. Já o mesmo protocolo de treinamento nos animais tratados com rotenona mostrou aumento significativo tanto nos níveis de beclina-1 quanto nos níveis de LC3 II. Entretanto o aumento da beclina-1 é relativo ao controle DMSO, enquanto o aumento para LC3 II é relativo ao controle rotenona sedentário (Figura 16B, C e D).

Em suma, não há alterações na atividade proteossomal em nenhum dos grupos, os níveis de beclina-1 aumentaram com o tratamento e a prática regular do exercício nos animais tratados aumentou tanto os níveis de beclina-1 quanto os níveis de LC3 II.

Figura 16 – Atividade do proteossomo (A,B), níveis de Beclina-1 (C) e LC3II (D) no córtex motor de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e submetidos a diferentes protocolos de exercício físico moderado. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) $\pm$ desvio padrão nos grupos: sedentário, exercício após tratamento com rotenona (G1), exercício antes do tratamento com rotenona (G2) e prática regular (G3; antes, durante e depois do tratamento com

rotenona). * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

4.4 Medula cervical, torácica e lombar

4.4.1 Efeitos do tratamento e do treinamento nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

Visando esclarecer respostas relacionadas aos neurônios motores inferiores foram analisadas as regiões cervical, torácica e lombar da medula espinhal. Nos resultados encontrados pode-se verificar que o tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona não altera os níveis de H_2O_2 em nenhuma das regiões da medula analisadas (Figuras 17A, 18A e 19A).

Para porcentagem de inibição da SOD verificamos que o tratamento com rotenona levou a alterações significativas somente na região da medula torácica. Tal alteração representa uma maior ativação da enzima relativa ao seu controle DMSO (Figuras 17B, 18B e 19B).

Considerando a atividade da enzima GPx verifica-se que a rotenona não promoveu alteração na medula cervical, mas na medula torácica e lombar há aumento de atividade quando comparada ao controle DMSO (Figuras 17C, 18C e 19C). Já para a enzima GR não houve alterações na região da medula cervical, houve um aumento da atividade na região da medula torácica relativo ao controle DMSO e diminuição da atividade na medula lombar, também relativo ao controle DMSO (Figuras 17D, 18D e 19D).

Figura 17 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, **A**), porcentagem de inibição da Superóxido Dismutase (SOD, **B**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **C**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **D**) na medula cervical de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado após o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) para os níveis de H₂O₂, GPx e GR ou relativos (média ± desvio padrão) para a porcentagem de inibição da SOD. * p≤0,05 em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e [#] p≤0,05 em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

O grupo DMSO treinado após o tratamento apresenta as seguintes respostas para os níveis de H₂O₂: houve aumento nos níveis na medula cervical comparado ao DMSO sedentário; aumento, também na medula torácica, comparado ao DMSO sedentário; e não houve alterações nos níveis na medula lombar (Figura 17A, 18A e 19A).

O percentual de inibição da SOD não se alterou em nenhuma das regiões da medula analisadas para os animais treinados após o tratamento com DMSO (Figuras 17B, 18B e 19B).

Ainda analisando enzimas antioxidantes, a enzima GPx demonstrou aumento na atividade quando comparado ao grupo DMSO sedentário na medula cervical. Na medula torácica também houve aumento da atividade da GPx relativo ao controle DMSO sedentário enquanto na medula lombar foi possível observar diminuição da atividade quando comparamos ao grupo DMSO sedentário (Figuras 17C, 18C e 19C).

Figura 18 - Níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , **A**), porcentagem de inibição da Superóxido Dismutase (SOD, **B**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **C**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **D**) na medula torácica de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado após o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) para os níveis de H_2O_2 , GPx e GR ou relativos (média $\pm$

desvio padrão) para a porcentagem de inibição da SOD. * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

A atividade da GR aumentou significativamente na região da medula cervical e torácica quando comparado ao DMSO sedentário. Na medula lombar, entretanto, houve diminuição da atividade da GR relativo ao grupo DMSO sedentário (Figura 17D, 18D e 19D).

Os resultados encontrados para os parâmetros envolvidos no estresse oxidativo no grupo tratado com 1mg/kg/dia de rotenona e treinados após o tratamento mostraram respostas distintas para cada uma das regiões da medula. Os níveis de H_2O_2 não se alterou na região da medula cervical. Na medula torácica esses níveis aumentaram em relação ao rotenona sedentário. Já na medula lombar o aumento verificado foi significativamente maior tanto relativo ao controle DMSO quanto ao rotenona sedentário (Figura 17A, 18A e 19A).

Figura 19 - Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, **A**), porcentagem de inibição da Superóxido Dismutase (SOD, **B**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **C**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **D**) na medula lombar de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado após o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) para os níveis de H₂O₂, GPx e GR ou relativos (média ± desvio padrão) para a porcentagem de inibição da SOD. * p ≤ 0,05 em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # p ≤ 0,05 em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

Dados relacionados à porcentagem de inibição da enzima antioxidante SOD mostraram que há diferença significativa, na inibição, somente para a região da medula torácica. Nessa região a inibição da SOD foi maior, no grupo tratado com rotenona e treinado após o tratamento, tanto quando se comparam os resultados ao seu controle DMSO quanto quando se comparam com o rotenona sedentário (Figura 17B, 18B e 19B).

A atividade da GPx diminuiu tanto na região da medula cervical quanto torácica. A diminuição de atividade encontrada em ambas as regiões são diferentes significativamente tanto do controle DMSO quanto do rotenona sedentário. Já na medula lombar é possível observar aumento significativo da atividade da GPx relativo ao controle DMSO e ao rotenona sedentário (Figura 17C, 18C e 19C).

Por fim, os resultados encontrados para atividade da enzima GR mostrou diferença significativa somente para a região da medula torácica. Essa diferença é uma diminuição da atividade comparada tanto ao controle DMSO quanto ao rotenona sedentário (Figura 17D, 18D e 19D).

Resumindo, alterações mais expressivas foram encontradas somente para o grupo treinado após o tratamento, na medula torácica e lombar. Os resultados mostraram aumento nos níveis de H_2O_2 em ambas as áreas, diminuição da ativação da SOD e atividade da GPx na medula torácica e para medula lombar somente maior atividade da GPx.

4.3.2 Efeitos do treinamento físico moderado antes do tratamento com rotenona e da prática regular nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

Foram analisados parâmetros envolvidos no estresse oxidativo para animais treinados antes de receber o tratamento com rotenona e para animais treinados antes, durante e depois do tratamento. Nesse sentido, os níveis de H_2O_2 aumentaram significativamente somente para a região da medula cervical nos animais tratados com 1mg/kg/dia de rotenona após o treinamento. Nas

outras regiões da medula os níveis permaneceram sem diferenças significativas (Figura 20A, 21A, e 22A).

Analisando os resultados para atividade das enzimas antioxidantes GPx e GR, no mesmo grupo, observa-se que a única alteração encontrada é redução na atividade da GR na região da medula cervical. Não foram encontradas alterações para atividade da GPx em nenhuma das regiões da medula, nem alterações na GR para medula torácica e lombar (Figura 20B e C, 21B e C, 22B e C).

Considerando o grupo DMSO treinado regularmente pode-se verificar que os níveis de H_2O_2 aumentaram na medula cervical e torácica, quando comparados ao grupo DMSO treinado antes do tratamento. Não houve alterações nos níveis de H_2O_2 na medula lombar (Figura 20A, 21A e 22A).

Ainda relacionado ao estresse oxidativo, a atividade da GPx apresentou as seguintes respostas para os animais DMSO treinados regularmente: na medula cervical há aumento da atividade relativo ao DMSO treinado antes do tratamento; na medula torácica e lombar há diminuição da atividade relativo ao DMSO treinado antes do tratamento.

Figura 20 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, **A**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **B**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **C**) na medula cervical de ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes do tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes, durante e depois o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário). * p≤0,05 em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # p≤0,05 em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

A atividade da enzima antioxidante GR diminuiu na região da medula torácica. Na medula cervical e lombar a atividade permaneceu semelhante aos animais DMSO treinados antes do tratamento (Figura 20C, 21C e 22C).

Figura 21 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, **A**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **B**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **C**) na medula torácica de ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes do tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes, durante e depois o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário). * p≤0,05 em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e [#] p≤0,05 em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

Os resultados encontrados para níveis de H₂O₂ nas regiões da medula dos animais tratados com rotenona e treinados regularmente foram distintos em cada uma das regiões. Para medula cervical pode-se observar aumento significativo dos níveis tanto quando comparado ao seu controle DMSO bem como ao rotenona treinado antes do tratamento. Na medula torácica também

houve aumento, entretanto, esse aumento é relativo somente ao rotenona treinados antes do tratamento. Já na medula lombar não houve alterações nos níveis de H_2O_2 (Figura 20A, 21A e 22A).

A atividade da GPx mostrou aumento relativo ao rotenona treinado antes do tratamento na medula cervical. Na medula torácica também houve aumento da atividade da GPx, no entanto, esse aumento só é significativo quando comparado ao seu controle DMSO. Por fim, na medula lombar houve redução da atividade da GPx quando comparado com o grupo rotenona treinado antes do tratamento (Figura 20B, 21b e 22B).

Figura 22 – Níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , **A**), atividade da Glutathione Peroxidase (GPx, **B**) e atividade da Glutathione Redutase (GR, **C**) na medula lombar de ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado antes do tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona e ratos idosos submetidos ao treinamento físico moderado

antes, durante e depois o tratamento. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário). * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e # $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

Finalizando, os resultados relacionados ao estresse oxidativo na medula mostram redução da atividade da enzima GR na medula cervical relativo ao controle DMSO e ao rotenona treinado antes do tratamento. Para medula torácica a atividade também mostrou redução da atividade, no entanto, a diferença significativa é relativa ao rotenona treinado antes do tratamento. Diferente das outras regiões a medula lombar não apresentou alterações na atividade da GR (Figura 20C, 21C e 22C).

Enfim, o treinamento aplicado antes do tratamento aumenta os níveis de H_2O_2 na medula cervical, aumenta os níveis de H_2O_2 e atividade da GPx na medula cervical e torácica nos animais treinados regularmente.

4.3.3 Efeitos do tratamento e dos diferentes tempos de treinamento físico moderado sobre a atividade proteossomal.

Os resultados encontrados mostram que o tratamento afetou de maneira distinta a medula cervical, torácica e lombar. Considerando somente a ação do tratamento na atividade do proteossomo, o tratamento com 1mg/kg/dia não alterou a atividade na medula cervical, aumentou na medula torácica e diminuiu na medula lombar quando comparados com os animais DMSO sedentários (Figura 23A, C e E).

Considerando somente a ação do treinamento nos animais idosos DMSO, obteve-se diminuição da atividade do proteossomo, com o treinamento

após o tratamento, nas três regiões da medula espinhal (Figura 23A, C e E). O mesmo treinamento nos animais tratados com rotenona promoveu diminuição ainda maior na atividade do proteossomo nas três regiões da medula espinhal (Figura 23A, C e E).

O treinamento antes do tratamento, nos animais tratados com rotenona, não alterou a atividade proteossomal, mas o treinamento regular aumentou da atividade proteossomal nas três regiões da medula relativo ao grupo DMSO submetido ao mesmo protocolo de treinamento. Não foram encontradas alterações significativas, relativas ao DMSO treinado antes do tratamento, na atividade proteossomal para os animais DMSO treinados regularmente (Figura 23B, D e F).

Em suma, o tratamento com rotenona aumentou a atividade proteossomal na medula torácica e diminuiu na lombar. No grupo treinado após o tratamento a atividade proteossomal diminuiu em todas as áreas da medula e nos animais treinados regularmente a atividade proteossomal aumentou em todas as áreas.

Figura 23 – Atividade do proteossomo na medula cervical (A,B), medula torácica (C,D) e medula lombar (E,F) de ratos idosos tratados com 1mg/kg/dia de rotenona e submetidos a diferentes protocolos de exercício físico moderado. Os valores são apresentados como porcentagem do controle (DMSO sedentário) $\pm$ desvio padrão nos grupos: sedentário, exercício após tratamento com rotenona (G1), exercício antes do tratamento com rotenona (G2) e prática regular (G3; antes, durante e depois do tratamento com rotenona). * $p \leq 0,05$ em relação ao DMSO na mesma condição de treinamento e [#] $p \leq 0,05$ em relação ao sedentário na mesma condição de tratamento, segundo a análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do pós-teste de bonferroni. (n=5).

5. DISCUSSÃO

5.1 Hipocampo

5.1.1 O tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona altera parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

Mesmo os níveis de H_2O_2 não apresentando alterações com o tratamento de 1mg/kg/dia de rotenona, foi possível observar, nos resultados relacionados a outros parâmetros do estresse oxidativo, que a atividade antioxidante está alterada. Tanto a SOD está mais ativa, quanto a GPx e a GR mostram maior atividade. Então, possivelmente o aumento encontrado nas enzimas antioxidantes interfere diretamente nos níveis de H_2O_2 , justificando a manutenção dos níveis de H_2O_2 .

Tal relação pode ser estabelecida a partir de dados da literatura que descrevem as enzimas antioxidantes SOD e GPx como responsáveis pela dismutação de ânions de superóxido em H_2O_2 e redução de H_2O_2 , respectivamente (DAY, 2009). Assim, no presente estudo, o aumento da SOD poderia até ter elevado os níveis de H_2O_2 . Entretanto, o aumento da atividade da GPx pode ter equilibrado os níveis de H_2O_2 fazendo com que os níveis permanecessem inalterados.

Analisando os resultados encontrados para GPx, estudo realizado por Zafrilla e colaboradores (2006) corroboram com nossos resultados, mostrando que indivíduos idosos sem danos cognitivos apresentaram aumento da atividade da GPx quando comparados com indivíduos de dois diferentes estágios da doença de Alzheimer. Assim, podemos sugerir que o modelo utilizado no presente estudo representa estágios iniciais do processo neurodegenerativo.

Corroborando com isso, Puertas e colaboradores (2012) também verificaram diminuição das enzimas antioxidantes em pacientes em estágios iniciais de Alzheimer. Além disso, Camiletti-Moirón e colaboradores (2013), em uma revisão sistemática, colocam que o exercício aeróbico moderado é capaz de melhorar a função antioxidante no cérebro.

Em outra perspectiva, estudo antigo já demonstrou que com o envelhecimento o cérebro tende a sofrer um desbalanço oxidativo, como aumento das enzimas antioxidantes por exemplo. Esse desbalanço pode acelerar o processo de envelhecimento e consequentemente iniciar um processo neurodegenerativo (HUSSAIN; SLIKKER; ALI, 1995).

Ainda, outros estudos reforçam que desbalanços oxidativos e consequente aumento do estresse oxidativo são comuns durante o envelhecimento (BOKOV et al., 2004; SALMON; RICHARDSON; PEREZ, 2010; SANZ; STEFANATOS, 2008). Nesse sentido, podemos colocar que nosso modelo experimental representa um modelo de envelhecimento com susceptibilidade à desenvolver doenças neurodegenerativas.

Considerando a especificidade da região aqui analisada, o hipocampo, uma revisão publicada em 2004 por Serrano e Klann (2004) mostrou que esse desbalanço oxidativo na região do hipocampo pode prejudicar a memória e aprendizagem. Como já é bem estabelecido na literatura, essa região é a principal afetada na doença de Alzheimer com danos associados à perda da memória (KHAN et al., 2014).

Além disso, o aumento do estresse oxidativo é um parâmetro envolvido na própria doença de Alzheimer e é um dos fatores que levam à degeneração

de neurônios corticais, hipocampais e leva à maior vulnerabilidade de formação de placas amiloides (MARTIN, 2012; YAN; WANG; ZHU, 2012). Assim, os dados apresentados no presente estudo podem fornecer dados importantes para uma intervenção precoce em estudos posteriores.

5.1.2 Treinamento físico moderado aplicado em diferentes tempos do tratamento com rotenona leva a resultados distintos.

Considerando que o treinamento físico moderado foi aplicado em diferentes tempos do tratamento em cada um dos grupos, pode-se sugerir o momento em que a intervenção feita por meio do treinamento físico é importante. Nesse sentido propõe-se algumas hipóteses para cada uma das respostas.

Baseado nos dados discutidos anteriormente a respeito da regulação do balanço oxidativo tem-se que o treinamento aplicado após o tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona foi efetivo para reduzir os níveis de H_2O_2 no hipocampo de ratos idosos. Essa diminuição pode ter se dado a partir de uma maior inibição da SOD acompanhado do aumento de atividade da GPx.

A redução dos níveis de H_2O_2 pode ser considerada positiva se considerarmos que aumentos no estresse oxidativo podem levar a alguns danos celulares como danos no DNA e proteínas (VALKO et al., 2006). Ainda, a diminuição do tráfego de diferentes organelas devido ao aumento de peróxido de hidrogênio pode ser revertida com a diminuição de peróxido de hidrogênio na região do hipocampo, conforme demonstrado na literatura (FANG; BOURDETTE; BANKER, 2012).

Ainda considerando a redução nos níveis de H_2O_2 , outro estudo mostrou a eficiência do exercício em reduzir os níveis espécies reativas de oxigênio. Nesse mesmo estudo ainda foi relatado que além de amenizar o estresse oxidativo o exercício é capaz de ativar sinalização de BDNF (KWON et al., 2013). Assim, os presentes resultados parecem corroborar com dados existentes na literatura.

Durante a progressão da doença de Alzheimer a atividade da glutathione peroxidase tende a diminuir quando comparados indivíduos ainda sem danos cognitivos com diferentes estágios até a instalação do quadro da doença (ANSARI; SCHEFF, 2010). Considerando que o treinamento físico moderado aplicado em nosso modelo experimental aumentou a atividade da GPx, pode-se sugerir que as respostas celulares frente ao estresse oxidativo são preservadas com a prática de atividade física.

Radak e colaboradores (2007) mostraram que o exercício é capaz de modular o estado redox no cérebro, aumentando a resistência contra o estresse oxidativo e facilitando a recuperação do mesmo. Além disso, o exercício vem se mostrando eficiente em melhorar a vascularização, o metabolismo energético e a síntese de neurotrofinas. Todas essas melhoras contribuem para a prevenção da doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas associadas à idade (RADAK et al., 2010).

Desta forma, o treinamento físico pode ser um instrumento de intervenção sistêmica durante o envelhecimento e processos neurodegenerativos. Estudo realizado com ratos Wistar idosos mostrou que o exercício aeróbico moderado foi capaz de melhorar declínio na função mitocondrial e o controle de qualidade de proteína no músculo esquelético

causados pelo envelhecimento (KOLTAI et al., 2012). Tal benefício mostra que além de alterações no sistema nervoso central o treinamento oferece outros benefícios.

Assim, os resultados para a prática do exercício após o tratamento com rotenona sugerem respostas positivas na região do hipocampo e ainda pode-se propor benefícios sistêmicos a partir de dados relatados na literatura.

Os resultados para o grupo treinado antes do tratamento não mostraram grandes alterações nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo, sugerindo assim que talvez o treinamento antes não seja eficiente em amenizar possíveis danos no balanço oxidativo.

Já o treinamento aplicado regularmente (antes, durante e depois do tratamento com rotenona), levou a aumento dos níveis de H_2O_2 relativo ao rotenona treinado antes, bem como diminuição da atividade da GPx. Não se pode concluir se o aumento nos níveis da espécie reativa de oxigênio se deve somente à diminuição da atividade da GPx, ou se a SOD teve contribuição nessa alteração, uma vez que não foi possível quantificar a porcentagem de inibição para esse grupo.

Entretanto, com os resultados obtidos sugere-se que a diminuição da atividade da GPx pode aumentar a vulnerabilidade ao desenvolvimento da doença de Alzheimer, como foi demonstrado por Venkateshappa e colaboradores (2012) em um estudo onde o aumento do estresse oxidativo e diminuição da atividade antioxidante durante o envelhecimento aumentou a vulnerabilidade.

Reforçando a importância de se aumentar a atividade antioxidante, outro estudo realizado por (MAROSI et al., 2012) mostrou que associado ao aumento

da atividade da GPx e SOD com o exercício moderado, houve aumento nos níveis de PGC1- α e p-AMPK. Esses outros parâmetros estão envolvidos com biogênese mitocondrial que é reportada como fator benéfico na melhora de danos neurais durante o envelhecimento e doença de Alzheimer. Nesse sentido, os resultados para a prática regular em nosso estudo não se mostra eficiente na amenização do processo de envelhecimento e neurodegeneração.

Por outro lado, mesmo o treinamento regular não reduzindo os níveis de H₂O₂, pode-se sugerir que o exercício pode oferecer outros benefícios na região do hipocampo, como a ação anti-inflamatória do exercício em ratos idosos, visto que a inflamação também é um marcador de desordens neurodegenerativas (GOMES DA SILVA et al., 2013). Reforçando a ação anti-inflamatória do exercício em ratos idosos Lovatel e colaboradores (2013) mostrou a eficiência do exercício em reduzir marcadores inflamatórios no hipocampo

Assim, nossos resultados para prática regular do exercício não podem ser considerados negativos, nossos dados não podem ser considerados isoladamente, uma vez que, outros parâmetros tão importantes quanto o estresse oxidativo podem ter tido melhoras com o treinamento.

Em suma, nossos resultados para o treinamento físico aplicado em diferentes tempos do tratamento com rotenona nos permite concluir que, considerando somente os dados analisados o exercício após o tratamento parece oferecer o melhor benefício. Por outro lado, não podemos considerar que o treinamento antes do tratamento e a prática regular acentuem os danos hipocampais durante o envelhecimento, já que outros parâmetros precisariam ser analisados para se chegar a uma resposta mais conclusiva.

5.1.3 O tratamento com rotenona aumenta os níveis de proteínas autofágicas em ratos idosos

O tratamento com rotenona não alterou a atividade do proteossomo no hipocampo. Entretanto, observa-se aumento significativo nos níveis de beclina-1 nas duas áreas, sugerindo maior indução da autofagocitose (LUCIN et al., 2013)

A diminuição da atividade do sistema proteossomal em outros estudos mostrou-se intimamente envolvido com aprendizagem e memória na doença de Alzheimer, mesmo antes da formação de placas amiloides (HSIA et al., 1999; IHARA; MORISHIMA-KAWASHIMA; NIXON, 2012). Nesse sentido, Lopez-Salon e colaboradores (2001) verificaram bloqueio da formação da memória a longo prazo ao inibir o proteossomo, caracterizando assim mecanismos desencadeados no desenvolvimento da doença. Considerando esses dados podemos sugerir que ainda não há prejuízos na memória do nosso modelo experimental.

Em relação aos resultados encontrados para beclina-1, estudo realizado por Pickford e colaboradores (2008), mostrou que em pacientes com Alzheimer os níveis de beclina-1 encontram-se diminuídos. Assim, pode-se considerar que o tratamento utilizado no presente estudo se trata de doses que não causam a agregação. O dano causado pela rotenona pode ainda não ter comprometido essa via. Assim, a resposta do organismo pode estar associada inclusive à prevenção da agregação proteica e reestabelecimento da homeostase.

Tal relação pode ser estabelecida a partir do estudo realizado por Jaeger e colaboradores (2010) em que a beclina-1 é capaz de regular os níveis de proteína precursora amiloide (APP). A toxicidade da baixa dose de rotenona pode ter desencadeado um mecanismo compensatório para evitar, por exemplo, um aumento nos níveis de beta-amiloide. Ainda considerando que a beclina-1 interage com outras proteínas que mantêm as funções neuronais (SALMINEN et al., 2013), a manutenção dos seus níveis é benéfica para tentar manter a homeostase celular.

Já os resultados para os níveis da proteína LC3-II demonstram aumento somente na região do hipocampo. Levando em consideração os níveis de LC3-II junto aos níveis de beclina-1, pode-se inferir que esse aumento é uma consequência do aumento da indução da via autofágica.

Outra hipótese a ser considerada é de o aumento encontrado para LC3II estar associado a um dano no transporte axonal. Torres e colaboradores (2012) atribuíram o aumento de LC3II ao fato de a vesícula autofágica não se fundir com o lisossomo por uma falha no transporte dessas vesículas, o que podem ser manifestações precoces da doença de Alzheimer e que culmina com o acúmulo de diversas vesículas,

Já foi demonstrado por Melo e colaboradores (2013) que o tratamento com rotenona, em cultura de células, em doses que não causam a agregação é capaz de prejudicar o transporte de mitocôndrias. Essa falha se deve a desestabilização do microtúbulo através do aumento dos níveis de hiperfosforilação das proteínas tau.

Dados não publicados de nosso laboratório mostraram que o tratamento *in vivo* com rotenona na concentração de 1mg/kg/dia foi capaz de aumentar os

níveis de hiperfosforilação da tau no hipocampo. Assim, pode-se sugerir uma possível associação entre a desestabilização do microtúbulo e o aumento dos níveis de LC3II no presente estudo.

5.1.4 Treinamento físico moderado diminui a atividade proteossomal quando aplicado antes e após o tratamento com rotenona. Nível das proteínas autofágicas permanece inalterado.

Os resultados apresentados para atividade proteossomal nos animais tratados com rotenona em diferentes tempos do treinamento mostram que tanto o treinamento aplicado antes do tratamento quanto o treinamento após o tratamento diminuem a atividade do proteossomo.

Não há na literatura muitos estudos que mostrem o efeito do exercício no hipocampo de ratos idosos. Entretanto, estudos mostrando a ação do exercício moderado na atividade proteossomal no músculo esqueléticos de camundondos adultos relata que o exercício foi capaz de aumentar a atividade do proteossomo (Cunha e colaboradores (2012).

Considerando que a recuperação na atividade do proteossomo também pode estar associada à melhora da memória (Timothy, 2014), o exercício se mostrou capaz de oferecer esse benefício no estudo realizado por Rampon e colaboradores (2000), onde o ambiente enriquecido com roda de exercício espontâneo foi capaz de recuperar déficits de memória em camundongos com deleção no gene NMDAR1.

Relacionando a atividade proteossomal com a doença de Alzheimer, Butterfield e colaboradores (2006) verificaram que pacientes de Alzheimer possuem maiores níveis de proteínas oxidadas que idosos de mesma idade

sem a doença. Visto que a degradação de proteínas oxidadas é realizada pelo proteossomo e independente de ubiquitinação (DAVIES, 2001; PICKERING; DAVIES, 2012)

Apesar do treinamento aplicado em nosso modelo não ter alterado os níveis de proteínas relacionadas à via autofágica, estudo realizado por He e colaboradores (2012) mostrou que o exercício praticado durante 8 semanas é capaz de regular a via autofágica no cérebro de ratos. O aumento dos níveis de beclina-1 e LC3II a partir do exercício pelos autores acima citados são tidos como benéficos. Ainda, outro estudo mostrou aumento nos níveis tanto de beclina-1 quanto de LC3II no músculo esquelético de ratos idosos submetidos a 8 semanas de exercício (Kim e colaboradores (2013). Tal resposta se assemelha aos resultados encontrados para ação do treinamento dos animais sem tratamento com rotenona.

Em suma, as análises realizadas para os grupos tratados com rotenona e submetidos ao treinamento não nos permite concluir qual o melhor momento para se iniciar uma intervenção com exercício.

5.2 Substância negra e locus coeruleus

5.2.1 O tratamento com rotenona altera a atividade das enzimas

Glutathione peroxidase e Glutathione reductase na substância negra.

Os resultados para os parâmetros envolvidos no estresse oxidativo na região da substância negra e locus coeruleus mostrou que não houve alteração nos níveis de H₂O₂.

Nesse sentido, consideração em relação à concentração de rotenona foi feita por Greenamyre e colaboradores (2001), que descreveram em uma

revisão que redução de 25-50% na atividade do complexo I podem não impactar na diminuição da produção de ATP. Assim, podemos atribuir a não alteração nos níveis de H_2O_2 a uma quantidade insuficiente de rotenona para causar alteração na produção de H_2O_2 .

Por outro lado, a manutenção da atividade da SOD e aumento da atividade da GPx, na substância negra, pode sugerir que o aumento da atividade foi suficiente para manter os níveis de H_2O_2 sem alterações significativas.

Considerando o aumento da atividade da GPx, pode-se sugerir que ainda há um equilíbrio oxidativo em nosso modelo experimental, uma vez que Venkateshappa e colaboradores (2012) mostraram que em cérebros postmortem de idosos, a atividade de enzimas antioxidantes como a GPx tendem a diminuir sua atividade na substância negra com o avanço da idade. Essa diminuição está relacionada a maior susceptibilidade ao desenvolvimento de neurodegeneração.

Corroborando com esses dados, outro estudo demonstrou que a diminuição da função antioxidante na substância negra contribui para o envelhecimento fisiológico e desenvolvimento da doença de Parkinson (HARISH et al., 2013). Assim, pode-se sugerir que nosso tratamento com rotenona não foi capaz de causar um desbalanço oxidativo. Entretanto, não podemos afirmar somente a partir desses dados que não há outras alterações celulares contribuindo para o início do processo neurodegenerativo.

5.2.2 Estresse oxidativo está alterado nos animais tratados com rotenona submetidos ao treinamento físico moderado aplicado regularmente e após o tratamento.

Os resultados encontrados para os parâmetros envolvidos no estresse oxidativo na associação de tratamento e exercício mostraram diferentes respostas para cada protocolo. O treinamento aplicado após o tratamento mostrou que o exercício foi capaz de reduzir os níveis de H_2O_2 na substância negra de ratos idosos tratados com rotenona. Essa redução foi possível mesmo com o aumento da ativação da SOD e diminuição da atividade da GPx.

Considerando a regulação dessa via, tal resultado pode ser justificado através da ação da catalase, outra enzima antioxidante não analisada no presente estudo e que também é responsável pela redução dos níveis de H_2O_2 . Já foi descrito há muito tempo que o exercício é capaz de aumentar a atividade da catalase no músculo (ALESSIO; GOLDFARB, 1988). Podemos sugerir então que essa regulação possa estar ocorrendo na região da substância negra.

Apesar de não ser possível afirmar exatamente o mecanismo capaz de reduzir os níveis de H_2O_2 na região analisada, pode-se certamente sugerir que o exercício é capaz de atuar de forma benéfica na homeostase redox (RADAK et al., 2014).

Além dos benefícios relatados para a homeostase redox, Chen e Gibson (2008) afirmam que a diminuição de H_2O_2 pode sugerir diminuição de apoptose e regulação da via autofágica evitando a morte celular. Tais resultados reforçam os benefícios sugeridos pelo exercício.

No que diz respeito ao exercício e regulação do estresse oxidativo na doença de Parkinson, estudo realizado por Tuon e colaboradores (2012), demonstraram que o exercício físico aplicado durante 8 semanas de 3 a 4 sessões por semana, foi capaz de diminuir parâmetros do estresse oxidativo no estriado de ratos modelos de Parkinson.

Outros benefícios também foram proporcionados pelo exercício em neurônios dopaminérgicos já em quadros instalados de doença de Parkinson. Quatro semanas de exercício foi capaz de diminuir a perda de neurônios dopaminérgicos em ratos para modelo de Parkinson (SUNG et al., 2012) aumentar os fatores neurotróficos derivados do cérebro e da glia (BDNF e GDNF) (TAJIRI et al., 2010).

Ainda relacionando o exercício com um quadro já instalado da doença, os resultados encontrados por Bloomer e colaboradores (2008) demonstram diminuição de H_2O_2 e aumento de SOD e GPx em pacientes após o exercício como um benefício.

Já para os resultados analisados para o treinamento aplicado antes do tratamento e a prática regular, resultados significativos foram encontrados em ambos os protocolos. Entretanto, podemos observar aumento nos níveis de H_2O_2 somente para a prática regular tanto na substância negra quanto no locus coeruleus.

Esse aumento encontrado nos níveis de H_2O_2 pode sugerir um desbalanço oxidativo. Entretanto, alguns estudos já tem sugerido que aumento nos níveis de H_2O_2 pode não estar associado diretamente com dano celular (BALABAN; NEMOTO; FINKEL, 2005; VEAL; DAY; MORGAN, 2007)

Em contrapartida a sinalização antioxidante mostrou alterações nas duas regiões não só para o treinamento regular, mas também para o treinamento aplicado antes do tratamento. Na substância negra, a alteração ocorreu somente para a atividade da GR, tanto no exercício antes quanto na prática regular. No locus coeruleus, podemos observar alterações tanto na GPx, quanto GR para ambos os protocolos.

A manutenção da atividade da GPx encontrada na região da substância negra em ambos os protocolos de exercício vão ao encontro de alguns dados encontrados na literatura. Somani e colaboradores (1995) também não encontraram alterações na atividade da GPx no estriado, quando ratos Sprague-dawley foram treinados por 7,5 semanas. Mais recentemente Tuon e colaboradores (2012), também não encontraram alterações nos níveis de GPx, com apenas 7 dias de exercício, em um quadro já caracterizado de doença de Parkinson.

Já o aumento encontrado na região do locus coeruleus, corrobora com dados anteriormente citados da literatura. O exercício aumenta a atividade da GPx, como ocorreu para o treinamento antes do tratamento. Em relação ao treinamento regular, apesar da atividade ser significativamente menor em relação ao controle DMSO, a atividade é semelhante ao grupo treinado antes do tratamento.

Além das regulações já discutidas até aqui, outro mecanismo regulando a defesa antioxidante em neurônios dopaminérgicos foi recentemente demonstrado por Tsou e colaboradores (2014) na prática do exercício moderado durante quatro semanas.

Em suma, o protocolo de treinamento aplicado antes do tratamento não provoca grandes alterações nas áreas aqui analisadas e a prática regular parece não atuar de maneira eficiente nos parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

5.2.3 O tratamento com rotenona aumenta a atividade do proteossomo e os níveis de LC3 II na substância negra de ratos idosos. A região do locus coeruleus demonstrou diminuição da atividade proteossomal.

Em relação ao tratamento com rotenona na substância negra, nossos resultados demonstraram que há um aumento da atividade proteossomal e aumento nos níveis de LC3 II.

Apesar do nosso tratamento com rotenona provocar aumento na atividade do proteossomo, a literatura demonstra que com o próprio envelhecimento a atividade do proteossomo diminui, e essa condição é favorável ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como Parkinson e também é uma das características da doença (DAHLMANN, 2007; LOW, 2011). Além disso, já foi demonstrado na literatura que a rotenona tem sido eficiente em inibir o proteossomo (CHOU et al., 2010).

Em relação ao aumento dos níveis de LC3 II, aumentos nos níveis dessa mesma proteína e diminuição nos níveis de p62 foram relacionados com a toxicidade de células de SH-SY5Y tratadas com rotenona por Xiong e colaboradores (2013). Mader e colaboradores (2012) também encontraram um acúmulo de LC3II com o tratamento com rotenona e atribuíram esse acúmulo de vesículas à diminuição de ATP causada pela droga.

Assim, o aumento encontrado pode estar relacionado a um déficit no tráfego das vesículas autofágicas, uma vez que este é dependente de ATP. Tal hipótese é reforçada por Arduíno e colaboradores (2012) onde o acúmulo de vesículas autofágicas que não se fundiram com o lisossomo foi observado em células híbridas contendo mitocôndrias de pacientes com Parkinson, em que o tráfego através do microtúbulo havia sido interrompido.

Resultados já encontrados na literatura também mostram que a rotenona é capaz de inibir a degradação lisossomal de vacúolos autofágicos (MADER et al., 2012). Considerando que o acúmulo desses vacúolos está relacionado doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (GHAVAMI et al., 2014; SON et al., 2012; TAN et al., 2014), podemos sugerir que o tratamento utilizado no presente estudo mimetiza alterações encontradas nas doenças neurodegenerativas.

Pode-se sugerir então, que os resultados encontrados para LC3II são esperados com o tratamento com rotenona e que essa resposta pode desencadear uma cascata de eventos, que a longo prazo culmina com a neurodegeneração, considerando que os animais utilizados no presente estudo não apresentavam sintomas motores.

Em contrapartida, a região do locus coeruleus apresentou resultados que corroboram com os dados da literatura para atividade proteossomal. O tratamento com rotenona diminuiu a atividade do proteossomo. Em concordância com esse resultado, estudo Hoglinger e colaboradores (2003) verificaram em cultura de células neurais, diminuição na atividade do proteossomo ao inibir o complexo I mitocondrial com rotenona. Assim como Chou e colaboradores (2010) que também encontraram significativa inibição da

atividade do proteossomo ao tratar células HEK e SK-N-MC com rotenona. O autor atribui essa inibição ao dano causado no complexo I, uma vez que ao inibir outros complexos a atividade do proteossomo não foi alterada.

No entanto, não foi possível observar alterações nos níveis de proteínas envolvidas na via autofágica para a região do locus coeruleus. Assim, mais uma vez os resultados encontrados para o nosso modelo tratado com rotenona são contraditórios para as vias de degradação.

5.2.4 Treinamento físico moderado aplicado em diferentes tempos do tratamento com rotenona apresenta resultados distintos.

Considerando os resultados para os animais tratados com rotenona encontra-se que tanto na região da substância negra quanto locus coeruleus, o treinamento aplicado antes do tratamento e o treinamento após o tratamento diminuíram a atividade do proteossomo.

Nesse sentido, já foi demonstrado na literatura que o exercício, diminui a atividade do proteossomo no músculo esquelético (Cunha, et al., 2011). Ainda, resposta demonstrando a diminuição dessa atividade no cérebro, com o exercício, foi encontrada por Szabo e colaboradores (2010), em ratos submetido a injúria neural.

Apesar do comprometimento do proteossomo estar relacionado a danos celulares, alguns estudos mostram que a inibição desse sistema pode trazer benefícios. Um benefício demonstrado pela literatura é a sua relação com as conexões e plasticidade sinápticas. A inibição do proteossomo foi capaz de melhorar a plasticidade sináptica (HEGDE; UPADHYA, 2007; ZHAO; HEGDE; MARTIN, 2003). Portanto, a inibição causada pelo exercício pode ser benéfica.

Reforçando esses benefícios, o exercício que no presente estudo inibiu o proteossomo pode estar relacionado à plasticidade nessa e nas demais regiões do cérebro. O estudo citado acima, realizado por Szabo e colaboradores (2010) com ratos Sprague-Dawley que sofreram um trauma neural, mostrou que o exercício foi capaz de restabelecer o dano sináptico. Os autores encontraram diminuição do estresse oxidativo e inibição da atividade do proteossomo, se assemelhando aos nossos resultados.

Ainda, o exercício pode trazer outros benefícios além da melhora da atividade antioxidante já citada e diminuição da toxicidade. Garcia e colaboradores (2012) encontraram no protocolo de exercício forçado moderado melhora no córtex motor, cerebelo e estriado das proteínas sinápticas em ratos jovens. Assim, o exercício empregado no presente estudo pode trazer outras melhoras, não avaliadas, e que contribuem na melhora da cognição que estão diretamente relacionadas com o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Contrário à maioria dos resultados encontrados para a prática do exercício, a região do locus coeruleus mostrou aumento da atividade proteossomal para o treinamento aplicado regularmente. Como já foi discutido anteriormente, dados da literatura colocam que a diminuição da atividade do proteossomo está relacionada com o processo neurodegenerativo. Assim, o aumento proporcionado pela prática regular também pode ser considerada benéfica.

Em suma, tanto a diminuição da atividade do proteossomo, quanto o aumento possuem embasamento teórico que suportam benefícios para

qualquer uma das respostas. Não há um consenso na literatura sobre a melhor resposta.

Ainda considerando os resultados para as vias de degradação, os níveis de proteína beclina-1 e LC3 II mostraram alterações significativas somente para a região da substância negra. Entre os resultados encontrados podemos destacar a redução dos níveis de LC3 II para o treinamento aplicado antes do tratamento.

Dentro do que já foi discutido até o presente momento, pode-se dizer que o exercício aplicado antes do tratamento oferece os melhores benefícios, uma vez que, a diminuição dos níveis de LC3 II pode sugerir estimulação autofágica. Vários estudos colocam a estimulação da autofagia como possível alvo terapêutico (DADAKHUJAEV et al., 2010; HARRIS; RUBINSZTEIN, 2012; JIANG et al., 2013; PAN et al., 2009; RYU et al., 2013), desta forma sugere-se que mais estudos sejam realizados com esse protocolo de exercício para confirmar sua eficiência em estimular essa via.

A falta de dados na literatura que tenham investigado o efeito do exercício na autofagia do sistema nervoso dificulta a discussão dos dados encontrados. O que se sabe até hoje em relação ao exercício e essa via foi analisado em músculo esquelético ou cardíaco, como já foi discutido anteriormente. As respostas do presente estudo certamente contribuirão para a descrição do efeito do exercício na autofagia neural.

5.3 Córtex motor e medula espinhal

5.3.1 Neurônios motores são sensíveis ao tratamento com rotenona e sofrem alterações relacionadas ao estresse oxidativo.

Sabendo que os neurônios motores são mais sensíveis aos efeitos do treinamento físico, todos os parâmetros analisados para as outras áreas do cérebro, foram analisados também nos neurônios motores.

Os resultados encontrados para níveis de H_2O_2 mostraram que o tratamento com 1mg/kg/dia de rotenona não foi capaz de alterar esses níveis. Estudo realizado por Samantaray e colaboradores (2007), mostrou que ao tratar ratos Lewis com rotenona (2,5mg/kg/dia) houve morte de neurônios motores na medula cervical e lombar. Apesar da concentração utilizada no presente estudo ainda não apresentar alterações nos níveis de H_2O_2 , outras alterações que afetem a homeostase celular já podem estar ocorrendo.

Uma prova de que outras alterações já estão ocorrendo nessas áreas são os resultados encontrados para as enzimas antioxidantes. Podemos observar maior ativação da SOD no córtex e medula torácica; maior atividade da GPx na medula torácica e lombar. Assim, podemos concluir que o tratamento utilizado foi capaz de alterar em neurônios motores, parâmetros envolvidos no estresse oxidativo.

5.3.2 Diferentes protocolos de treinamento físico alteram parâmetros envolvidos no estresse oxidativo em neurônios motores.

Como já encontrado em outras regiões, o treinamento aplicado após o tratamento foi o único capaz de diminuir os níveis de H_2O_2 no córtex motor. Em todas as outras, as alterações significativas encontradas foram aumento

nesses níveis: O treinamento aplicado após o tratamento aumentou os níveis de H_2O_2 na medula torácica e lombar; O treinamento aplicado antes do tratamento aumentou os níveis na medula cervical; e o treinamento aplicado regularmente aumentou os níveis no córtex motor, medula cervical e torácica.

Apesar dos resultados para neurônios motores mostrarem aumento das espécies reativas de oxigênio com a prática do exercício físico moderado, estudo realizado por McCullough e colaboradores (2013), mostrou que 2 semanas de exercício foi capaz de regular positivamente os níveis de GDNF (fator neurotrófico derivado de células da glia) em ratos idosos.

Outro estudo também já mostrou anteriormente que o exercício prolongado é capaz de aumentar a angiogênese e o volume sanguíneo cerebral no córtex motor primário, de ratos adultos (SWAIN et al., 2003). Assim, o exercício pode trazer outros benefícios para as regiões aqui analisadas, que podem não estar diretamente envolvidas com o estresse oxidativo.

Há poucos estudos relacionando os efeitos do exercício na medula, o que dificulta a discussão dos dados obtidos. Entretanto, no que diz respeito a alterações mitocondriais causadas pelo exercício, protocolo de exercício aplicado três vezes por semana no rotarod durante 2 meses foi capaz de aumentar a atividade do citocromo C oxidase, nas regiões do córtex e amígdala, em animais idosos quando comparados aos sedentários (SAMPEDRO-PIQUERO et al., 2013).

Considerando os resultados para as enzimas antioxidantes, pode-se relacionar os resultados encontrados para os níveis de H_2O_2 nos animais treinados após o tratamento no córtex motor, à diminuição da ativação da SOD.

Pode-se sugerir tal regulação, mas sem estabelecer uma relação de causa e efeito, uma vez que seriam necessárias outras análises para tal afirmação.

Para os outros protocolos de exercício não foram encontradas diferenças significativas nas atividades das enzimas antioxidantes na região do córtex motor. Apesar disso, tem-se com o treinamento regular o aumento nos níveis de H_2O_2 já citado acima, e as respostas obtidas no presente estudo não nos permite sugerir por qual via essa alteração pode ter se dado.

Nas regiões da medula, resultados diversos foram encontrados para as enzimas antioxidantes. Entre esses resultados destaca-se inibição da SOD e da GPx na medula torácica que pode ter refletido diretamente no aumento dos níveis de H_2O_2 nos animais submetido ao treinamento após o tratamento.

Para o mesmo protocolo de exercício na medula lombar, a ativação da SOD permaneceu inalterada, a atividade da GPx aumentou e mesmo assim temos aumento significativo para os níveis de H_2O_2 . Assim, sugere-se envolvimento da catalase na regulação desses níveis, a qual não foi analisada no presente estudo (DRINGEN; PAWLOWSKI; HIRRLINGER, 2005). Resposta semelhante a essa foi encontrada na medula cervical para o protocolo de treinamento regular

Como as enzimas antioxidantes têm função de reduzir as espécies reativas de oxigênio, as quais podem desencadear processos de morte celular, tratamento já vem sendo proposto com genes antioxidantes como tentativa de reduzir a morte celular (NAVARRO-YEPES et al., 2013). Nesse sentido, considerando a importância de se elevar os níveis de antioxidantes sugere-se que diferentes protocolos de exercício parecem atuar nessa regulação.

Estudo realizado por Powers e colaboradores (1999), já mostrou a eficiência do exercício em aumentar as enzimas antioxidantes no músculo esquelético. Também já foi observado aumento das enzimas oxidantes em eritrócitos de ratos submetidos ao exercício agudo exaustivo (OZTASAN et al., 2004).

Em suma, os resultados encontrados por esse estudo, sugerem que o protocolo de treinamento aplicado após o tratamento no córtex motor demonstrou maiores benefícios sobre os parâmetros envolvidos no estresse oxidativo em neurônios motores.

5.3.3 Regulação das vias de degradação em neurônios motores com o tratamento e diferentes tempos de aplicação do protocolo de treinamento.

O tratamento com rotenona aumentou a atividade proteossomal na medula torácica e diminuiu na lombar..

Como já discutido anteriormente, a diminuição da atividade do proteossomo é esperada com a idade e com as doenças neurodegenerativas. Nesse sentido o tratamento parece ter agido de maneira eficaz na região da medula lombar.

O sinal redox da glutathione também é um regulador do sistema de degradação proteossomal e interfere na degradação de proteínas oxidadas ou não estruturadas (SILVA et al., 2012). Um estudo realizado por Kretz-Remy e Arrigo (2003) demonstrou que o aumento de glutathione peroxidase diminui a degradação de LLVY, mostrando que a atividade do proteossomo pode apresentar diminuição quando há aumento da GPx. Corroborando com essas

evidências da literatura as respostas encontradas no presente estudo parecem reforçar a regulação sugerida na região da medula cervical e torácica.

Já os resultados para a via autofágica só foi possível analisar para a região do córtex motor, que demonstrou aumento nos níveis de beclina-1, sugerindo com a literatura até aqui discutida um aumento da indução da autofagia. Assim, pode-se sugerir que esta via está preservada mesmo com o tratamento com rotenona.

Considerando os diferentes protocolos de exercício aplicados, em relação a atividade proteossomal nos neurônios motores foi possível encontrar respostas similares para cada área da medula considerando o mesmo protocolo de exercício. O treinamento após o tratamento diminuiu a atividade proteossomal, enquanto a prática regular foi capaz de aumentá-la.

Levando em consideração que o aumento da atividade proteossomal é benéfico, a prática regular nos animais tratados parece aumentar essa atividade, mostrando que assim como exercício vem sendo benéfico em doenças como diabetes e hipertensão, pode também regular alterações relacionadas à neurodegeneração (MOLMEN-HANSEN et al., 2012; SIGAL et al., 2007; SOUSA et al., 2013).

Para a região do córtex motor o exercício não alterou a atividade proteossomal, entretanto, pode-se observar alterações na via autofágica. Corroborando com os benefícios encontrados para a atividade proteossomal na medula, no córtex a prática regular também aparece aumentando o fluxo autofágico. Podemos observar aumento nos níveis tanto de beclina-1 quanto de LC3 II para os animais tratados.

Assim sendo, a prática regular demonstrou, nas áreas aqui analisadas, maiores benefícios no que diz respeito às vias de degradação. Sendo que na medula observa-se uma recuperação da atividade proteossomal, enquanto no córtex motor observa-se maior indução da autofagia.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pudemos inferir que o tratamento com rotenona foi capaz de induzir alterações celulares relacionadas às doenças neurodegenerativas. Assim sendo, o tratamento utilizado parece mimetizar alterações celulares que ocorrem anteriormente à agregação proteica.

O protocolo de treinamento físico utilizado foi capaz de regular alguns parâmetros nos ratos controles:

- Aumentou a atividade antioxidante em quase todas as áreas analisadas, o que talvez possa explicar a manutenção dos níveis de H_2O_2 , exceto na medula.
- Diminuiu a atividade do proteossomo somente no protocolo de exercício após implantação das mini bombas osmóticas.
- Regulou positivamente a via autofágica na maior parte das áreas encefálicas.

O exercício aplicado no modelo de rotenona apresenta ações distintas para cada uma das regiões e protocolos:

- O protocolo de exercício aplicado após o tratamento com rotenona diminuiu os níveis de H_2O_2 no hipocampo, substância negra e córtex, acompanhado de um aumento na atividade da GPx no hipocampo; diminuição a atividade do proteossomo e não alteração da via autofágica.
- O protocolo de exercício antes do tratamento aumentou a atividade da GPx no hipocampo, córtex, locus coeruleus e medula cervical, diminuiu a atividade do proteossomo no hipocampo, substância negra e locus coeruleus. Ainda, os níveis de LC3II diminuíram na substância negra.
- O protocolo de prática regular demonstrou de uma forma geral que o exercício aumentou os níveis H_2O_2 em quase todas as áreas analisadas, exceto córtex e medula lombar. A atividade da GPx também está diminuída nas áreas

encefálicas. Com relação à degradação celular, houve aumento da ativação da autofagia no córtex e diminuição na substância negra, a atividade do proteossomo aumentou no locus coeruleus e áreas da medula.

Em suma, até o presente momento, os resultados encontrados para o treinamento aplicado após do tratamento parecem trazer maiores benefícios dentro dos parâmetros oxidativos. Em relação às vias de degradação o treinamento antes do tratamento foi o único capaz de diminuir os níveis de LC3 II em um das regiões analisadas. A prática regular se mostrou eficiente em neurônios motores, aumentando a atividade proteossomal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSIO, H. M.; GOLDFARB, A. H. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. **J Appl Physiol** (1985), v. 64, n. 4, p. 1333-6, Apr 1988.

ALONSO, A. D. et al. Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 23, p. 8864-8869, Jun 6 2006.

AMARAL, S. L. et al. Time course of training-induced microcirculatory changes and of vegf expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 5, p. 424-31, May 2008.

American College of Sports Medicine position stand. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness in healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 22, n. 2, p. 265-74, Apr 1990.

ANSARI, M. A.; SCHEFF, S. W. Oxidative stress in the progression of Alzheimer disease in the frontal cortex. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 69, n. 2, p. 155-67, Feb 2010.

ARDUINO, D. M. et al. Mitochondrial metabolism in Parkinson's disease impairs quality control autophagy by hampering microtubule-dependent traffic. **Hum Mol Genet**, v. 21, n. 21, p. 4680-702, Nov 1 2012.

ARRASATE, M. et al. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. **Nature**, v. 431, n. 7010, p. 805-10, Oct 14 2004.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483-95, Feb 25 2005.

BARRACHINA, M. et al. Lysosome-associated membrane protein 1 (LAMP-1) in Alzheimer's disease. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 32, n. 5, p. 505-16, Oct 2006.

BARRETO, A. C. P.; NEGRÃO, C. E. **Cardiologia do Exercício**. 2010.

BCRC. Rat Dissection Protocol. <http://bcrc.bio.umass.edu/intro/content/rat-dissection-protocol>, Acesso em: 15/01.

BENDISKE, J. et al. Intracellular deposition, microtubule destabilization, and transport failure: an "early" pathogenic cascade leading to synaptic decline. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 61, n. 7, p. 640-50, Jul 2002.

BHERER, L.; ERICKSON, K. I.; LIU-AMBROSE, T. A Review of the Effects of Physical Activity and Exercise on Cognitive and Brain Functions in Older Adults. **J Aging Res**, v. 2013, p. 657508, 2013.

BLOOMER, R. J. et al. Effect of resistance training on blood oxidative stress in Parkinson disease. **Med Sci Sports Exerc**, v. 40, n. 8, p. 1385-9, Aug 2008.

BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mech Ageing Dev**, v. 125, n. 10-11, p. 811-26, Oct-Nov 2004.

BUTTERFIELD, D. A. et al. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: insights into the development of Alzheimer's disease. **Neurobiol Dis**, v. 22, n. 2, p. 223-32, May 2006.

CAMILETTI-MOIRON, D. et al. Does exercise reduce brain oxidative stress? A systematic review. **Scand J Med Sci Sports**, v. 23, n. 4, p. e202-e212, Aug 2013.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **J Biol Chem**, v. 250, n. 14, p. 5475-80, Jul 25 1975.

CARRO, E. et al. Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. **J Neurosci**, v. 21, n. 15, p. 5678-84, Aug 1 2001.

CHEN, Y.; GIBSON, S. B. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? **Autophagy**, v. 4, n. 2, p. 246-8, Feb 2008.

CHOI, W. S.; PALMITER, R. D.; XIA, Z. Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model. **J Cell Biol**, v. 192, n. 5, p. 873-82, Mar 7 2011.

CHOU, A. P. et al. Mechanisms of rotenone-induced proteasome inhibition. **Neurotoxicology**, v. 31, n. 4, p. 367-72, Aug 2010.

CHU, C. T. et al. Autophagy in neurite injury and neurodegeneration: in vitro and in vivo models. **Methods Enzymol**, v. 453, p. 217-49, 2009.

CHURCHER, I. Tau therapeutic strategies for the treatment of Alzheimer's disease. **Curr Top Med Chem**, v. 6, n. 6, p. 579-95, 2006.

COLLIER, T. J.; KANAAN, N. M.; KORDOWER, J. H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 6, p. 359-66, Jun 2011.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C.; CHRISTIE, L. A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 9, p. 464-72, Sep 2007.

CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. **Age Ageing**, v. 39, n. 4, p. 412-23, Jul 2010.

CUERVO, A. M.; WONG, E. S.; MARTINEZ-VICENTE, M. Protein degradation, aggregation, and misfolding. **Mov Disord**, v. 25 Suppl 1, p. S49-54, 2010.

CUNHA, T. F. et al. Aerobic exercise training upregulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice. **J Appl Physiol**, v. 112, n. 11, p. 1839-46, Jun 2012.

DADAKHUJAEV, S. et al. Autophagy protects the rotenone-induced cell death in alpha-synuclein overexpressing SH-SY5Y cells. **Neurosci Lett**, v. 472, n. 1, p. 47-52, Mar 12 2010.

DAHLMANN, B. Role of proteasomes in disease. **Bmc Biochemistry**, v. 8, Nov 22 2007.

DAVIES, K. J. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. **Biochimie**, v. 83, n. 3-4, p. 301-10, Mar-Apr 2001.

DAY, B. J. Catalase and glutathione peroxidase mimics. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 3, p. 285-96, Feb 1 2009.

DE-PAULA, V. J. et al. Alzheimer's disease. **Subcell Biochem**, v. 65, p. 329-52, 2012.

DIMEO, F. et al. Aerobic exercise reduces blood pressure in resistant hypertension. **Hypertension**, v. 60, n. 3, p. 653-8, Sep 2012.

DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P. G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brain cells. **J Neurosci Res**, v. 79, n. 1-2, p. 157-65, Jan 1-15 2005.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

DUKES, A. A.; KORWEK, K. M.; HASTINGS, T. G. The effect of endogenous dopamine in rotenone-induced toxicity in PC12 cells. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 5-6, p. 630-8, May-Jun 2005.

DUMONT, M.; BEAL, M. F. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 5, p. 1014-26, Sep 1 2011.

EBNETH, A. et al. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. **J Cell Biol**, v. 143, n. 3, p. 777-94, Nov 2 1998.

EISBACH, S. E.; OUTEIRO, T. F. Alpha-synuclein and intracellular trafficking: impact on the spreading of Parkinson's disease pathology. **J Mol Med (Berl)**, v. 91, n. 6, p. 693-703, Jun 2013.

EL KADMIRI, N. et al. [Genetic aspects of Alzheimer's disease (Review)]. **Pathol Biol (Paris)**, v. 61, n. 6, p. 228-38, Dec 2013.

ERICKSON, K. I.; GILDENGERS, A. G.; BUTTERS, M. A. Physical activity and brain plasticity in late adulthood. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 99-108, Mar 2013.

ERICKSON, K. I. et al. Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 7, p. 3017-22, Feb 15 2011.

FANG, C.; BOURDETTE, D.; BANKER, G. Oxidative stress inhibits axonal transport: implications for neurodegenerative diseases. **Mol Neurodegener**, v. 7, p. 29, 2012.

FATO, R. et al. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta**, v. 1787, n. 5, p. 384-92, May 2009.

FJELL, A. M. et al. What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. **Progress in Neurobiology**, v. 117, p. 20-40, Jun 2014.

FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 114-21, 1984.

FOCK, K. M.; KHOO, J. Diet and exercise in management of obesity and overweight. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 28 Suppl 4, p. 59-63, Dec 2013.

FRANKER, M. A.; HOOGENRAAD, C. C. Microtubule-based transport - basic mechanisms, traffic rules and role in neurological pathogenesis. **J Cell Sci**, v. 126, n. Pt 11, p. 2319-29, Jun 1 2013.

FRITSCH, T. et al. Parkinson disease: research update and clinical management. **South Med J**, v. 105, n. 12, p. 650-6, Dec 2012.

GARBER, C. E. et al. American College of Sports Medicine position stand. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 43, n. 7, p. 1334-59, Jul 2011.

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.

GHAVAMI, S. et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. **Prog Neurobiol**, v. 112, p. 24-49, Jan 2014.

GIBB, W. R.; LEES, A. J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 51, n. 6, p. 745-52, Jun 1988.

GOMES DA SILVA, S. et al. Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. **J Neuroinflammation**, v. 10, p. 61, 2013.

GREENAMYRE, J. T. et al. Complex I and Parkinson's disease. **IUBMB Life**, v. 52, n. 3-5, p. 135-41, Sep-Nov 2001.

HANNA, J. et al. A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 747-59, May 18 2007.

HARDY, J.; SELKOE, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. **Science**, v. 297, n. 5580, p. 353-6, Jul 19 2002.

HARISH, G. et al. Alteration in Glutathione Content and Associated Enzyme Activities in the Synaptic Terminals but not in the Non-synaptic Mitochondria from the Frontal Cortex of Parkinson's Disease Brains. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 1, p. 186-200, Jan 2013.

HARRIS, H.; RUBINSZTEIN, D. C. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 2, p. 108-117, Feb 2012.

HE, C.; SUMPTER, R., JR.; LEVINE, B. Exercise induces autophagy in peripheral tissues and in the brain. **Autophagy**, v. 8, n. 10, p. 1548-51, Oct 2012.

HE, L. Q.; LU, J. H.; YUE, Z. Y. Autophagy in ageing and ageing-associated diseases. **Acta Pharmacol Sin**, v. 34, n. 5, p. 605-11, May 2013.

HEGDE, A. N.; UPADHYA, S. C. The ubiquitin-proteasome pathway in health and disease of the nervous system. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 11, p. 587-95, Nov 2007.

HENG, M. Y. et al. Early autophagic response in a novel knock-in model of Huntington disease. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 19, p. 3702-20, Oct 1 2010.

HERRERA, E.; CARAMELLI, P.; NITRINI, R. Estudo epidemiológico populacional de demência na cidade de Catanduva, Estado de São Paulo, Brasil. **Rev Psiquiatr Clin**, v. 25, p. 70-3, 1998.

HOGLINGER, G. U. et al. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 86, n. 5, p. 1297-307, Sep 2003.

HSIA, A. Y. et al. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 6, p. 3228-33, Mar 16 1999.

HUA, F. et al. [Autophagy in ageing and ageing-related diseases]. **Yao Xue Xue Bao**, v. 49, n. 6, p. 764-73, Jun 2014.

HUANG, J. et al. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rotenone-induced cell apoptosis: relevance to protein misfolding and aggregation. **Brain Res**, v. 1279, p. 1-8, Jul 7 2009.

HUSSAIN, S.; SLIKKER, W., JR.; ALI, S. F. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. **Int J Dev Neurosci**, v. 13, n. 8, p. 811-7, Dec 1995.

IBGE. "Número de idosos no Brasil vai quadruplicar até 2060". http://www.bbc.co.uk/portuguese/noticias/2013/08/130829_demografia_ibge_populacao_brasil_lgb.shtml: IBGE: p. 2010.

IHARA, Y.; MORISHIMA-KAWASHIMA, M.; NIXON, R. The ubiquitin-proteasome system and the autophagic-lysosomal system in Alzheimer disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 8, 2012.

IQBAL, K. et al. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. **Curr Alzheimer Res**, v. 7, n. 8, p. 656-64, Dec 2010.

IRWIN, D. J.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q. Parkinson's disease dementia: convergence of alpha-synuclein, tau and amyloid-beta pathologies. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 626-36, Sep 2013.

JAEGER, P. A. et al. Regulation of Amyloid Precursor Protein Processing by the Beclin 1 Complex. **PLoS One**, v. 5, n. 6, Jun 15 2010.

JIANG, T. F. et al. Curcumin ameliorates the neurodegenerative pathology in A53T alpha-synuclein cell model of Parkinson's disease through the downregulation of mTOR/p70S6K signaling and the recovery of macroautophagy. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 8, n. 1, p. 356-69, Mar 2013.

JUNG, T.; CATALGOL, B.; GRUNE, T. The proteasomal system. **Mol Aspects Med**, v. 30, n. 4, p. 191-296, Aug 2009.

KARBOWSKI, M.; NEUTZNER, A. Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. **Acta Neuropathol**, v. 123, n. 2, p. 157-171, Feb 2012.

KHAN, Z. U. et al. Memory Deficits in Aging and Neurological Diseases. **Molecular Basis of Memory**, v. 122, p. 1-29, 2014.

KIM, Y. A. et al. Autophagic response to exercise training in skeletal muscle with age. **J Physiol Biochem**, v. 69, n. 4, p. 697-705, Dec 2013.

KINNI, H. et al. Cerebral metabolism after forced or voluntary physical exercise. **Brain Res**, v. 1388, p. 48-55, May 4 2011.

KOLTAI, E. et al. Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein quality control factors are minimized by exercise training. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 303, n. 2, p. R127-34, Jul 15 2012.

KOVACS, G. G. et al. Linking pathways in the developing and aging brain with neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 269, p. 152-72, Jun 6 2014.

KRAMER, A. F. et al. Ageing, fitness and neurocognitive function. **Nature**, v. 400, n. 6743, p. 418-9, Jul 29 1999.

KRETZ-REMY, C.; ARRIGO, A. P. Modulation of the chymotrypsin-like activity of the 20S proteasome by intracellular redox status: effects of glutathione peroxidase-1 overexpression and antioxidant drugs. **Biol Chem**, v. 384, n. 4, p. 589-95, Apr 2003.

KUBESCH, S. et al. Aerobic endurance exercise improves executive functions in depressed patients. **J Clin Psychiatry**, v. 64, n. 9, p. 1005-12, Sep 2003.

KWON, D. H. et al. Exercise ameliorates cognition impairment due to restraint stress-induced oxidative insult and reduced BDNF level. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 434, n. 2, p. 245-251, May 3 2013.

LAI, Y. et al. Autophagy is increased after traumatic brain injury in mice and is partially inhibited by the antioxidant gamma-glutamylcysteinyl ethyl ester. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 28, n. 3, p. 540-50, Mar 2008.

LEE, J. A. Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin. **BMB Rep**, v. 42, n. 6, p. 324-30, Jun 30 2009.

LENAZ, G. et al. Mitochondrial bioenergetics in aging. **Biochim Biophys Acta**, v. 1459, n. 2-3, p. 397-404, Aug 15 2000.

LI, W. W. et al. Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. **Neuroreport**, v. 18, n. 15, p. 1543-6, Oct 8 2007.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radic Biol Med**, v. 60, p. 1-4, Jul 2013.

LOPEZ-SALON, M. et al. The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 11, p. 1820-1826, Dec 2001.

LOVATEL, G. A. et al. Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. **Neurobiol Learn Mem**, v. 101, p. 94-102, Mar 2013.

LOW, P. The role of ubiquitin-proteasome system in ageing. **Gen Comp Endocrinol**, v. 172, n. 1, p. 39-43, May 15 2011.

LUCIN, K. M. et al. Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease. **Neuron**, v. 79, n. 5, p. 873-86, Sep 4 2013.

MA, Q. et al. Age-related autophagy alterations in the brain of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. **Exp Gerontol**, Mar 6 2011.

MADER, B. J. et al. Rotenone inhibits autophagic flux prior to inducing cell death. **ACS Chem Neurosci**, v. 3, n. 12, p. 1063-72, Dec 19 2012.

MAROSI, K. et al. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. **Neuroscience**, v. 226, p. 21-8, Dec 13 2012.

MARTIN, L. J. Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 107, p. 355-415, 2012.

MAYEUX, R. Epidemiology of neurodegeneration. **Annu Rev Neurosci**, v. 26, p. 81-104, 2003.

MCCULLOUGH, M. J.; GYORKOS, A. M.; SPITSBERGEN, J. M. Short-term exercise increases GDNF protein levels in the spinal cord of young and old rats. **Neuroscience**, v. 240, p. 258-68, Jun 14 2013.

MCMORRIS, T. et al. A test of the catecholamines hypothesis for an acute exercise-cognition interaction. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 89, n. 1, p. 106-15, Mar 2008.

MELO, A. et al. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2011, p. 467180, 2011.

MELO, T. Q. et al. Rotenone-dependent changes of anterograde motor protein expression and mitochondrial mobility in brain areas related to

neurodegenerative diseases. **Cell Mol Neurobiol**, v. 33, n. 3, p. 327-35, Apr 2013.

MOE, B.; AUGESTAD, L. B.; NILSEN, T. I. Diabetes severity and the role of leisure time physical exercise on cardiovascular mortality: the Nord-Trondelag Health study (HUNT), Norway. **Cardiovasc Diabetol**, v. 12, p. 83, 2013.

MOLMEN-HANSEN, H. E. et al. Aerobic interval training reduces blood pressure and improves myocardial function in hypertensive patients. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 19, n. 2, p. 151-160, Apr 2012.

MORA, F. Successful brain aging: plasticity, environmental enrichment, and lifestyle. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 15, n. 1, p. 45-52, Mar 2013.

MUKHERJEE, R.; CHAKRABARTI, O. Mitochondrial quality control: decommissioning power plants in neurodegenerative diseases. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 180759, 2013.

NATHALIE, P.; JEAN-NOEL, O. Processing of amyloid precursor protein and amyloid peptide neurotoxicity. **Curr Alzheimer Res**, v. 5, n. 2, p. 92-9, Apr 2008.

NAVARRO-YEPES, J. et al. Antioxidant gene therapy against neuronal cell death. **Pharmacol Ther**, Dec 12 2013.

NIXON, R. A. Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **Neurobiol Aging**, v. 26, n. 3, p. 373-82, Mar 2005.

NIXON, R. A. Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat? **Trends Neurosci**, v. 29, n. 9, p. 528-535, Sep 2006.

OCTAVE, J. N. [Alzheimer disease: cellular and molecular aspects]. **Bull Mem Acad R Med Belg**, v. 160, n. 10-12, p. 445-9; discussion 450-1, 2005.

ONU. **Relatório sobre a Situação da População Mundial 2011**. <http://www.un.org/files/PT-SWOP11-WEB.pdf>; ONU 2013.

OZTASAN, N. et al. Endurance training attenuates exercise-induced oxidative stress in erythrocytes in rat. **Eur J Appl Physiol**, v. 91, n. 5-6, p. 622-7, May 2004.

PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Mitophagy in neurodegeneration and aging. **Front Genet**, v. 3, p. 297, 2012.

PAN, T. et al. Rapamycin Protects against Rotenone-Induced Apoptosis through Autophagy Induction. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 541-551, Dec 1 2009.

PATEL, B. P.; HAMADEH, M. J. Nutritional and exercise-based interventions in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. **Clin Nutr**, v. 28, n. 6, p. 604-17, Dec 2009.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 6th. Amsterdam ; Boston ; : Academic Press/Elsevier, 2007. ISBN 9780125476126 (spiral binding)
0125476124 (spiral binding)
9780123737212 (CD-ROM)
0123737214 (CD-ROM).

PHINNEY, A. L. et al. Enhanced sensitivity of dopaminergic neurons to rotenone-induced toxicity with aging. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 12, n. 4, p. 228-38, May 2006.

Physical activity guidelines for Americans. **Okla Nurse**, v. 53, n. 4, p. 25, Dec-2009 Feb 2008.

PICKERING, A. M.; DAVIES, K. J. Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 109, p. 227-48, 2012.

PICKFORD, F. et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 6, p. 2190-2199, Jun 2008.

PLOUGHMAN, M. Exercise is brain food: the effects of physical activity on cognitive function. **Dev Neurorehabil**, v. 11, n. 3, p. 236-40, Jul 2008.

POWERS, S. K.; JI, L. L.; LEEUWENBURGH, C. Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 31, n. 7, p. 987-97, Jul 1999.

PUERTAS, M. C. et al. Plasma oxidative stress parameters in men and women with early stage Alzheimer type dementia. **Exp Gerontol**, v. 47, n. 8, p. 625-30, Aug 2012.

RADAK, Z. et al. Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis**, v. 20, n. 3, p. 777-83, 2010.

RADAK, Z. et al. The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise. **Free Radical Research**, v. 48, n. 1, p. 84-92, Jan 2014.

RADAK, Z. et al. Effects of exercise on brain function: role of free radicals. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 32, n. 5, p. 942-6, Oct 2007.

RAMI, A. Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter and/or incendiary? **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 35, n. 5, p. 449-61, Oct 2009.

RAMPON, C. et al. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. **Nat Neurosci**, v. 3, n. 3, p. 238-44, Mar 2000.

RAVIKUMAR, B.; SARKAR, S.; RUBINSZTEIN, D. C. Clearance of mutant aggregate-prone proteins by autophagy. **Methods Mol Biol**, v. 445, p. 195-211, 2008.

REDDY, P. H. Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. **Brain Res**, v. 1415, p. 136-148, Sep 30 2011.

RIGOULET, M.; YOBUE, E. D.; DEVIN, A. Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H₂O₂ Signaling. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 3, p. 459-468, Feb 2011.

ROMANO, A. D. et al. Bioenergetics and Mitochondrial Dysfunction in Aging: Recent Insights For a Therapeutical Approach. **Curr Pharm Des**, Sep 26 2013.

RUGARLI, E. I.; LANGER, T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. **EMBO J**, v. 31, n. 6, p. 1336-49, Mar 21 2012.

RYNDERS, C. A. et al. Effects of exercise intensity on postprandial improvement in glucose disposal and insulin sensitivity in prediabetic adults. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 1, p. 220-8, Jan 2014.

RYU, H. W. et al. Amurensin G induces autophagy and attenuates cellular toxicities in a rotenone model of Parkinson's disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 433, n. 1, p. 121-6, Mar 29 2013.

SALMINEN, A. et al. Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. **Prog Neurobiol**, v. 106, p. 33-54, Jul-Aug 2013.

SALMON, A. B. Oxidative stress in the etiology of age-associated decline in glucose metabolism. **Longev Healthspan**, v. 1, p. 7, 2012.

SALMON, A. B.; RICHARDSON, A.; PEREZ, V. I. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 5, p. 642-655, Mar 1 2010.

SAMANTARAY, S. et al. The Parkinsonian neurotoxin rotenone activates calpain and caspase-3 leading to motoneuron degeneration in spinal cord of Lewis rats. **Neuroscience**, v. 146, n. 2, p. 741-755, May 11 2007.

SAMPEDRO-PIQUERO, P. et al. Effects of forced exercise on spatial memory and cytochrome c oxidase activity in aged rats. **Brain Res**, v. 1502, p. 20-9, Mar 28 2013.

SANZ, A.; STEFANATOS, R. K. The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view. **Curr Aging Sci**, v. 1, n. 1, p. 10-21, Mar 2008.

SCAZUFCA, M. et al. Investigações epidemiológicas sobre demência nos países em desenvolvimento. **Rev Saúde Pública**, v. 36, n. 6, p. 773-8, 2002.

SELKOE, D. J. The deposition of amyloid proteins in the aging mammalian brain: implications for Alzheimer's disease. **Ann Med**, v. 21, n. 2, p. 73-6, 1989.

SERRANO, F.; KLANN, E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. **Ageing Res Rev**, v. 3, n. 4, p. 431-43, Nov 2004.

SHANG, F.; TAYLOR, A. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 1, p. 5-16, Jul 1 2011.

SHERER, T. B. et al. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 341, n. 2, p. 87-90, May 1 2003.

SIERRA, C.; LOPEZ-SOTO, A.; COCA, A. [Hypertension in the elderly population]. **Rev Esp Geriatr Gerontol**, v. 43 Suppl 2, p. 53-9, Oct 2008.

SIGAL, R. J. et al. Effects of aerobic training, resistance training, or both on glycemic control in type 2 diabetes - A Randomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 147, n. 6, p. 357-369, Sep 18 2007.

SILVA, G. M. et al. Redox control of 20S proteasome gating. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, n. 11, p. 1183-94, Jun 1 2012.

SMITH, J. C. et al. Physical activity reduces hippocampal atrophy in elders at genetic risk for Alzheimer's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 6, Apr 23 2014.

SOMANI, S. M.; RAVI, R.; RYBAK, L. P. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 50, n. 4, p. 635-9, Apr 1995.

SON, J. H. et al. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. **Exp Mol Med**, v. 44, n. 2, p. 89-98, Feb 29 2012.

SOUSA, N. et al. Long-term effects of aerobic training versus combined aerobic and resistance training in modifying cardiovascular disease risk factors in healthy elderly men. **Geriatr Gerontol Int**, Feb 26 2013.

SQUIER, T. C. Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. **Exp Gerontol**, v. 36, n. 9, p. 1539-50, Sep 2001.

STARKOV, A. A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1147, p. 37-52, Dec 2008.

STOIAN, I.; OROS, A.; MOLDOVEANU, E. Apoptosis and free radicals. **Biochem Mol Med**, v. 59, n. 2, p. 93-7, Dec 1996.

STOREY, E.; CAPPAL, R. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Abeta peptide. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 25, n. 2, p. 81-97, Apr 1999.

STRONG, M. J.; KESAVAPANY, S.; PANT, H. C. The pathobiology of amyotrophic lateral sclerosis: a proteinopathy? **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 64, n. 8, p. 649-64, Aug 2005.

SUNG, Y. H. et al. Treadmill exercise ameliorates dopaminergic neuronal loss through suppressing microglial activation in Parkinson's disease mice. **Life Sci**, v. 91, n. 25-26, p. 1309-1316, Dec 17 2012.

SUTOO, D.; AKIYAMA, K. Regulation of brain function by exercise. **Neurobiol Dis**, v. 13, n. 1, p. 1-14, Jun 2003.

SWAIN, R. A. et al. Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. **Neuroscience**, v. 117, n. 4, p. 1037-46, 2003.

SZABO, Z. et al. Voluntary exercise may engage proteasome function to benefit the brain after trauma. **Brain Research**, v. 1341, p. 25-31, Jun 23 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.

TAN, C. C. et al. Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy. **Neurobiol Aging**, Nov 28 2013.

_____. Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy. **Neurobiol Aging**, v. 35, n. 5, p. 941-57, May 2014.

TANIDA, I. Autophagosome Formation and Molecular Mechanism of Autophagy. **Antioxid Redox Signal**, Dec 4 2010.

TORRES, M. et al. Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. **Mol Neurodegener**, v. 7, p. 59, 2012.

TSOU, Y. H. et al. Treadmill exercise activates Nrf2 antioxidant system to protect the nigrostriatal dopaminergic neurons from MPP toxicity. **Exp Neurol**, Oct 5 2014.

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. 305-12, Dec 27 2012.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 2, p. 335-44, Oct 15 2003.

UHLENDORF, T. L. et al. Neuroprotective effects of moderate aerobic exercise on the spastic Han-Wistar rat, a model of ataxia. **Brain Res**, v. 1369, p. 216-22, Jan 19 2011.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 10 2006.

VEAL, E. A.; DAY, A. M.; MORGAN, B. A. Hydrogen peroxide sensing and signaling. **Mol Cell**, v. 26, n. 1, p. 1-14, Apr 13 2007.

VENKATESHAPPA, C. et al. Elevated Oxidative Stress and Decreased Antioxidant Function in the Human Hippocampus and Frontal Cortex with Increasing Age: Implications for Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 8, p. 1601-1614, Aug 2012.

VENKATESHAPPA, C. et al. Increased Oxidative Damage and Decreased Antioxidant Function in Aging Human Substantia Nigra Compared to Striatum: Implications for Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 2, p. 358-369, Feb 2012.

WAKABAYASHI, K. et al. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. **Neuropathology**, v. 27, n. 5, p. 494-506, Oct 2007.

WANG, Y. et al. Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. **Hum Mol Genet**, v. 18, n. 21, p. 4153-70, Nov 1 2009.

WATANABE, M. et al. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. **Neurobiol Dis**, v. 8, n. 6, p. 933-41, Dec 2001.

WHO. Facts about aging. 2014. Disponível em: <
<http://www.who.int/ageing/about/facts/en/>>.

WONG, E.; CUERVO, A. M. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. **Nat Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 805-11, Jul 2010.

XIONG, N. et al. The role of autophagy in Parkinson's disease: rotenone-based modeling. **Behav Brain Funct**, v. 9, p. 13, 2013.

YAN, M. H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radic Biol Med**, Nov 29 2012.

ZAFRILLA, P. et al. Oxidative stress in Alzheimer patients in different stages of the disease. **Curr Med Chem**, v. 13, n. 9, p. 1075-83, 2006.

ZHAO, Y. L.; HEGDE, A. N.; MARTIN, K. C. The ubiquitin proteasome system functions as an inhibitory constraint on synaptic strengthening. **Current Biology**, v. 13, n. 11, p. 887-898, May 27 2003.

ZHENG, J. et al. Involvement of lysosomes in the early stages of axon degeneration. **Neurochem Int**, v. 56, n. 3, p. 516-21, Feb 2010.

ZHENG, W. H. et al. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. **Neuroscience**, v. 115, n. 1, p. 201-11, 2002.

ZHOU, M. et al. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Anal Biochem**, v. 253, n. 2, p. 162-8, Nov 15 1997.

10. ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

OF. CEUA/IB/049/2011
Ref. 2011.1.862.41.2

São Paulo, 26 de setembro de 2011.

Prezada Senhora

Dirijo-me a V. Sa. para informar que a Comissão de Ética em Uso de Animais do IB (CEUA), em reunião realizada nesta data, **APROVOU** o Projeto "Autofagocitose e estresse oxidativo no sistema nervoso central de ratos idoso submetidos a atividade física espontânea" - **Protocolo 137/2011**, de sua responsabilidade (Colaboradora: Caroliny Moura da Silva).

Atenciosamente.

Prof. Dra. Mariz Vainzof

Coordenadora da Comissão de Ética no
Uso de Animais do IB (CEUA)

Ilma. Sra.

Prof. Dra. MERARI DE FÁTIMA RAMIRES FERRARI
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do IBUSP.

Rua do Matão - Travessa 14 nº 321 - CEP 05508-090 - Cidade Universitária
São Paulo - Brasil - <http://www.ib.usp.br>

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **03.11.11** tomou ciência do Projeto nº **452/11** intitulado **“AUTOFAGOCITOSE E ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS IDOSOS SUBMETIDOS A ATIVIDADE FÍSICA ESPONTÂNEA.”**, vinculado à pós-graduação do Programa de Fisiopatologia Experimental que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, onde o projeto será executado.

Pesquisador(a) Responsável: Merari de Fátima Ramires Ferrari

Pesquisador(a) Executante : Caroliny Moura da Silva

CEP-FMUSP, 03 de novembro de 2011.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador interino
Comitê de Ética em Pesquisa