



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

NEUROCIÊNCIAS

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA GLIAL

FIBRILAR ÁCIDA (GFAP) E COMPORTAMENTO MOTOR DE RATOS

SUBMETIDOS AO MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR

6-OHDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Márcio Ferreira Dutra

Porto Alegre

2009

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma das enfermidades neurológicas mais comuns na população idosa, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum, superada apenas pela doença de Alzheimer. A doença é progressiva e afeta primariamente indivíduos acima dos 55 anos de idade, embora adultos jovens e até crianças possam ser também afetadas (VAN DEN EEDEN et al.; 2003).

Esta doença decorre principalmente da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN) (Fig. 1), embora outras regiões encefálicas possam ser também afetadas (TOLOSA; WENNING; POEWE, 2006). O quadro clínico torna-se evidente quando a perda neuronal dopaminérgica ultrapassa aproximadamente 70-80% do total (GOEDERT, 2001) e a deficiência de dopamina estriatal é responsável pelos déficits motores facilmente identificáveis nos pacientes como bradicinesia, rigidez e tremor durante o repouso, os quais são os sintomas cardinais da DP (SCHOBER, 2004).

Além destes denominados sintomas cardinais, outras manifestações presentes ao longo da evolução da doença, em maior ou menor grau, incluem transtornos neuropsiquiátricos (como depressão e demência), disfunção vegetativa (hipotensão

postural, alterações esfinterianas, impotência) e sintomas sensitivos, como dor (MIYASAKI et al., 2006).

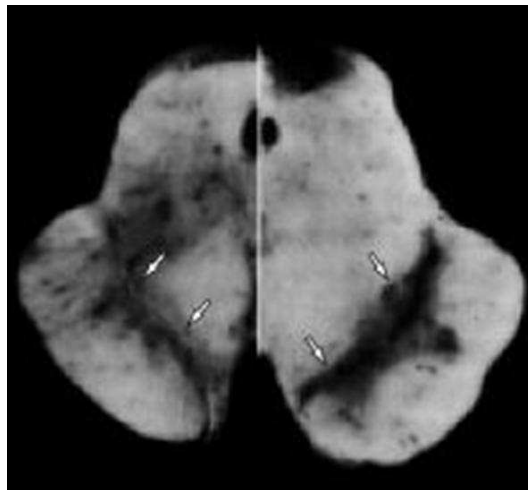


Fig. 1 - À esquerda: o mesencéfalo de um paciente com DP. A substância negra (área pigmentada) está consideravelmente reduzida (setas). À direita: o mesencéfalo de uma pessoa normal, mostrando a substância negra intacta (setas) (Modificado de: Purves et al., 2005).

1.1.1 Histórico da doença

A DP foi descrita inicialmente em 1817 pelo médico inglês James Parkinson em sua monografia intitulada “An Essay on the Shaking Palsy” a qual foi baseada na observação de 6 pacientes, 3 dos quais ele examinou pessoalmente e 3 que foram observados na rua. Parkinson definiu os sintomas, os diagnósticos diferenciais e fez considerações sobre a etiologia e o tratamento da enfermidade. A patologia denominada paralisia agitante foi definida como uma doença caracterizada pela presença de movimentos tremulares involuntários, com diminuição da força muscular, tendência de inclinação do tronco para a frente e alteração da marcha, tendo o sentido e o intelecto não afetados (PARKINSON, 1817).

Anteriormente a James Parkinson, a literatura médica cita descrições parciais da doença, como aquelas realizadas por Galeno e também por Leonardo da Vinci e

descrições de sintomas parkinsonianos também aparecem em textos egípcios e indianos (FINGER, 1994).

A mudança do nome da doença de paralisia agitante para DP foi sugerida por Jean-Martin Charcot, em homenagem à descrição clássica de James Parkinson. Charcot também contribuiu na descrição do quadro clínico, no diagnóstico diferencial e no tratamento da doença, tendo em vista que foi o primeiro neurologista a sugerir uma terapêutica para a DP com derivados alcalóides (PEARCE, 1992).

Apesar da compreensão dos aspectos clínicos e da evolução da DP, foi somente a partir da metade do século XX que os cientistas descobriram a patologia da doença e como tratar sua sintomatologia. Em 1919 Tretiakoff descreveu uma redução na quantidade dos neurônios na substância negra de pacientes com DP (KAPP, 1992) e nos anos 50 Carlsson descobriu que a L-dopa, precursor da dopamina, era capaz de reverter os sintomas motores de ratos tratados com reserpina, fármaco depletor das catecolaminas (CARLSSON, 1967).

Logo depois, nos anos 60, Hornykiewicz descobriu uma deficiência de dopamina nos núcleos da base (NB) e juntamente com Walther Birkmayer tentaram administrar dopamina para os pacientes. Apesar dos resultados promissores, a dose utilizada era muito elevada e os pacientes não toleravam os efeitos colaterais (HORNYKIEWICZ, 2001).

Em 1967, Cotzias conduziu um ensaio clínico placebo controlado com D-dopa (forma dextrógira da levodopa) e fenilalanina, entretanto não encontrou resultados satisfatórios. Dois anos mais tarde, Melvin Yah comprovou que a L-dopa (forma levógira) e não a D-dopa era o tratamento efetivo para a DP, apesar dos efeitos colaterais. Esses efeitos foram reduzidos com a introdução de dois inibidores periféricos da dopadescarboxilase, benserazida e carbidopa (GARCIA RUÍZ, 2002).

1.1.2 Epidemiologia

A DP é observada em todos os países, grupos étnicos e classes sócio-econômicas (ROPPER; BROWN, 2005) tendo uma prevalência estimada de 150 a 200 casos por 100.000 habitantes, representando uma das doenças neurológicas mais comuns (BARBOSA; LIMONGI; CUMMINGS, 1997). Segundo dados brasileiros estima-se que a doença tenha uma prevalência de aproximadamente 3,3% na população acima de 64 anos (BARBOSA et al., 2006). Afeta aproximadamente um milhão de americanos e 1 a 2% daqueles acima de 60 anos de idade no mundo todo, apresentando aumento da incidência com a idade. Acredita-se que o envelhecimento da população, fenômeno que vem sendo constatado em escala mundial, modifique de forma significativa essas estatísticas em um futuro próximo e as estimativas indicam que o número de pessoas afetadas pela DP irá triplicar nos próximos 50 anos (JANKOVIC, 2005).

A idade média do início da doença é de aproximadamente 55 anos, sendo porém mais precoce em casos de DP familiar e com componente genético (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Os estudos divergem quanto ao acometimento preferencial por gênero, mas na maioria se observa um predomínio no sexo masculino, em uma razão de 1,5:1 e até de 2:1 em relação ao sexo feminino (VAN DEN EEDEN et al., 2003). Um estudo realizado em 8 municípios italianos demonstrou, por exemplo, que os homens têm uma chance duas vezes maior de desenvolver DP quando comparados às mulheres (BALDERESCHI et al., 2003). Entretanto, a razão para esta diferença não está esclarecida, apesar de ter sido sugerido um possível efeito neuroprotetor dos estrogênios (DELAU; BRETELER, 2006).

Estudos de incidência de DP mostraram que a taxa de ocorrência da doença aumenta significativamente após a quinta década. Por exemplo, um estudo da

Califórnia de 2003 demonstrou uma incidência anual de 12,3 por 100.000 na população em geral, enquanto que para pessoas acima dos 50 anos a incidência foi de 44 por 100.000 (VAN DEN EEDEN et al., 2003).

1.1.3 Fatores ambientais

Muitos fatores ambientais já foram associados ao desenvolvimento da DP e parkinsonismo, mas nenhum foi definido de forma conclusiva como causador da DP (SHERER; BETARBET; GREENAMYRE, 2002). Dentre as exposições ambientais e ocupacionais implicadas na etiologia da DP, pode-se citar: ingestão de água de poço, pesticidas, herbicidas, vida rural, exposição a certos metais, campos magnéticos e minerais, entre outros (JANKOVIC, 2005). A hipótese mais aceita atualmente é que ocorra uma interação entre fatores ambientais e fatores genéticos (multifatorial) no desencadeamento da doença (WIRDEFELDT; GATZ; SCHANING, 2004).

A teoria da influência dos fatores ambientais na gênese da DP foi fortalecida na década de oitenta, quando jovens usuários de drogas da área da baía de São Francisco, nos Estados Unidos, injetaram inadvertidamente um subproduto da fabricação da meperidina, o MPTP (1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina) e desenvolveram um quadro muito semelhante à DP (SHERER; BETARBET; GREENAMYRE, 2002; HEALY; ABOU-SLEIMAN; WOOD, 2004). O MPTP induz toxicidade através de sua conversão pela monoamina oxidase B (MAO-B) em astrócitos para seu metabólito ativo MPP+, o qual é então seletivamente captado por neurônios dopaminérgicos, causando um defeito no complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, resultando em degeneração neuronal (GOEDERT, 2001; SHERER; BETARBET; GREENAMYRE, 2002). Esta constatação

permitiu o posterior desenvolvimento de modelos experimentais de DP em animais, que ainda são muito utilizados. No entanto, há diferenças importantes entre a DP idiopática e o parkinsonismo induzido por MPTP. Talvez a mais notável seja a ausência de corpos de Lewy, considerados como os marcadores patológicos da DP (GOEDERT, 2001).

Em um estudo italiano de 2003, um maior risco para DP foi observado em indivíduos de idade mais avançada, do sexo masculino, sem prática prévia de tabagismo e expostos a pesticidas. A hipótese mais simples para a associação entre pesticidas e DP é que os pesticidas ou seus metabólitos sejam diretamente tóxicos para a mitocôndria, cuja disfunção é considerada atualmente como um dos eventos-chave na fisiopatologia da DP (BALDERESCHI et al., 2003). Quanto ao tabagismo, observa-se uma associação inversa com a ocorrência de DP, porém a base biológica subjacente ainda não está bem compreendida. Uma das explicações atribuí a menor incidência de DP entre tabagistas ao fato de que a nicotina ser capaz de estimular a liberação de dopamina e agir como antioxidante (DELAU; BRETELER, 2006).

1.2 Redes neurais envolvidas na DP

Os sinais e sintomas motores da DP resultam primariamente das alterações funcionais dos núcleos da base (NB). Em razão de serem muito comuns, os distúrbios dos núcleos da base têm tido grande importância na neurologia clínica. A DP foi a primeira doença do sistema nervoso a ser identificada como uma doença molecular causada por um defeito específico no metabolismo de um

neurotransmissor, neste caso a dopamina produzida pelos neurônios localizados na parte compacta da substância negra (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003).

1.2.1 Núcleos da base: características gerais

Os núcleos da base são constituídos por vários núcleos subcorticais interconectados com projeções principalmente para o córtex cerebral, tálamo e tronco encefálico. Eles recebem importante aferência do córtex cerebral e do tálamo e enviam suas eferências de volta para o córtex cerebral (por meio do tálamo) e para o tronco encefálico. Assim, os núcleos da base são os principais componentes do grande circuito subcortical reentrante que liga o córtex cerebral e o tálamo, exercendo uma função essencial na execução dos movimentos voluntários normais e em várias funções cognitivas (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003).

Os quatro núcleos principais dos NB são: o estriado, o globo pálido, o núcleo subtalâmico e a substância negra (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003).

1.2.1.1 Corpo estriado

O estriado possui três subdivisões (o núcleo caudado, o putâmen e o estriado ventral) e é a principal porta das entradas dos NB. Projeções glutamatérgicas excitatórias chegam de várias áreas corticais motoras (córtex somatossensorial, motor e pré-motor) e límbicas associativas (amígdala, hipocampo, córtices orbital, entorrinal, temporal, pré-frontal, parietal, cingular e associativo) e do tálamo. O estriado também recebe aferências dopaminérgicas da parte compacta da substância negra (SNc) e da área tegmental ventral, aferências serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe e núcleo linear caudal e noradrenérgicas do lócus ceruleus (BLANDINI et al., 2000). Devido à diversidade de aferências, o estriado contém

diferentes receptores de neurotransmissores. Os receptores do glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazole propiônico (AMPA) são os mais abundantes (ALBIN et al., 1992), mas o estriado também expressa receptores dopaminérgicos das classes D1 e D2 (GERFEN; KEEFE; GAUDA, 1995), receptores da adenosina (A1, A2a, A2b e A3) (ROSIN et al., 2003), receptores gama-aminobutírico (GABA) (KULTAS-ILINSKY; LEONTIEV; WHITING, 1998) e receptores serotoninérgicos (5-HT2a, 5-HT2c e 5-HT6) (WRIGTH et al., 1995).

Os neurônios estriatais projetam-se para o globo pálido e para a substância negra. Esses dois núcleos possuem neurônios com corpos celulares morfologicamente semelhantes e enviam as principais projeções de saída dos NB (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003). Noventa e cinco por cento da população neuronal do corpo estriado é constituída por neurônios de projeção que usam o GABA como neurotransmissor. Os 5% dos neurônios restantes são constituídos por interneurônios que contém outros neurotransmissores tipo acetilcolina e neuropeptídeos como a somatostatina (BLANDINI et al., 2000). Também foi descrita a presença de neurônios dopaminérgicos no estriado (BETARBET, 1997).

1.2.1.2 Globo pálido

O globo pálido é dividido nos segmentos interno e externo que juntamente com o putâmen são conhecidos como núcleo lentiforme. Os dois segmentos são densamente povoados com neurônios GABAérgicos (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003).

O pálido interno (GPi) é o menor dos NB e está funcionalmente relacionado com a parte reticulada da substância negra (SNr) constituindo o principal núcleo de saída para o tálamo (núcleos talâmicos ventral anterior e lateral) e córtex cerebral.

Ele também envia projeções para o núcleo talâmico parafascicular (NTP), núcleo habenular (NH) e núcleo pedúnculo-pontino (NPP). Recebe projeções GABAérgicas do corpo estriado e GP adjacente e glutamatérgicas do núcleo subtalâmico (NST) e córtex frontal (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003).

O globo pálido externo (GPe) envia suas projeções GABAérgicas principalmente para o núcleo subtalâmico (NST), substância negra compacta, GPi, núcleo pedúnculo-pontino e núcleo talâmico ventral reticular (SMITH et al., 1998). Também têm-se descrito projeções colinérgicas e não colinérgicas para o córtex cerebral (BLANDINI et al., 2000). Projeções aferentes para o GPe têm origem principalmente no estriado (fibras GABAérgicas) e NST (fibras glutamatérgicas) (PARENT; HAZRATI, 1995). Aferência excitatória do tálamo também tem sido observada, assim como a inervação dopaminérgica da substância negra (YUNG et al., 1995).

1.2.1.3 Núcleo subtalâmico

O núcleo subtalâmico está intimamente conectado com ambos os segmentos do globo pálido e da substância negra. As células glutamatérgicas desse núcleo são as únicas projeções excitatórias dos núcleos da base (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003), enviando projeções excitatórias primariamente para os núcleos de saída do circuito: SNr e GPi e também para o GPe, estriado, SNc e córtex motor (BLANDINI et al., 2000; PARENT; HAZRATI, 1995).

Os neurônios subtalâmicos recebem inervação inibitória dos neurônios GABAérgicos do GPe, GPi e do núcleo acumbens. Também recebem inervação excitatória do córtex sensoriomotor, NTP e NPP. Inervação dopaminérgica da SNc

também foi encontrada (BLANDINI et al., 2000; FUJIMOTO; KITA, 1993; CANTERAS et al., 1990).

1.2.1.4 Substância negra

A substância negra (SN) está localizada no tegmento ventral do mesencéfalo e possuem duas partes, a parte compacta (SNc) e a parte reticulada (SNr), sendo esta última a maior (BLANDINI et al., 2000). As células da parte compacta são dopaminérgicas e também contêm neuromelanina, um pigmento escuro derivado da oxidação e polimerização da dopamina (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003). Uma pequena percentagem dos neurônios nigroestriatais contém GABA ao invés de dopamina (HERRERO; BARCIA; NAVARRO, 2002).

A maioria dos neurônios da SNr são GABAérgicos e projetam-se principalmente para os núcleos talâmicos ventral anterior e lateral, colículo superior (CS) e NPP. De maneira similar ao GPi, a SNr recebe projeções inibitórias do estriado, do GPe e NA e projeções excitatórias do NST (PARENT; HAZRATI, 1995).

Os neurônios da SNc projetam-se para o estriado, NST e GP. Também há evidência de eferência para o NA, amígdala e córtex cerebral. As aferências GABAérgicas principais são do estriado e GP e uma pequena parcela da SNr; as aferências glutamatérgicas são do córtex pré-frontal, NST e NPP e as serotoninérgicas do núcleo dorsal e medial da rafe (HAUBER, 1998).

1.2.2 Circuitos internos no complexo dos núcleos da base

As projeções dos neurônios espinhosos médios do caudado e do putâmen (juntos formando o corpo estriado) ao segmento interno do globo pálido (GPi) e a parte reticular da substância negra (SNr) constituem a chamada via direta (Fig. 2), a

qual serve para liberação dos neurônios motores superiores da inibição tônica causada pelo GPi (PURVES et al., 2005).

Uma segunda via serve para aumentar o nível de inibição tônica e é chamada de via indireta (Fig. 2). Esta via fornece uma segunda rota de ligação do corpo estriado com o GPi e a SNr, pois outra população de neurônios espinhosos médios projeta-se ao segmento externo do globo pálido (GPe). Esta divisão externa envia projeções tanto ao GPi como ao núcleo subtalâmico (NS). Entretanto, em vez do NS projetar-se a estruturas externas aos núcleos da base, este projeta-se de volta ao GPi e a SNr. Como já foi descrito, esses dois núcleos projetam-se para fora dos núcleos da base, permitindo assim que a via indireta influencie a atividade dos neurônios motores superiores (PURVES et al., 2005).

Portanto, a via indireta dos núcleos da base serve, aparentemente, para modular as ações desinibitórias da via direta. Os neurônios do núcleo subtalâmico que se projetam ao GPi e à SNr são excitatórios. Normalmente, quando a via indireta é ativada por sinais do córtex cerebral, os neurônios espinhosos médios disparam e inibem os neurônios GABAérgicos tonicamente ativos do GPe. Dessa forma as células subtalâmicas ficam mais ativas e, em virtude de suas sinapses excitatórias com as células do GPi e SNr, aumentam a influência inibitória dos núcleos da base. Logo, ao contrário da via direta, que quando ativada libera-se da inibição tônica, o efeito resultante da atividade da via indireta é aumentar a influência inibitória sobre os neurônios motores superiores (PURVES et al., 2005).

Outro circuito interno dos núcleos da base, descrito anteriormente, está relacionado com as células dopaminérgicas da SNc e modula a eferência do corpo estriado (Fig. 2). Os neurônios espinhosos médios do corpo estriado projetam-se diretamente à SNc, a qual, por sua vez, envia projeções dopaminérgicas de volta

para os neurônios espinhosos. As influências dopaminérgicas sobre estes neurônios são complexas: os mesmos neurônios nigrais podem fornecer aferências excitatórias mediadas pelos receptores dopaminérgicos do tipo D1 das células espinhosas que se projetam ao GPi (a via direta) e aferências inibitórias mediadas por receptores do tipo D2 das células espinhosas que se projetam ao GPe (a via indireta). Como as ações das vias direta e indireta sobre as eferências dos núcleos da base são antagônicas, essas influências diretas dos axônios nigroestriatais produzem o mesmo efeito, ou seja, uma diminuição do efluxo inibitório dos núcleos da base (PURVES et al., 2005).

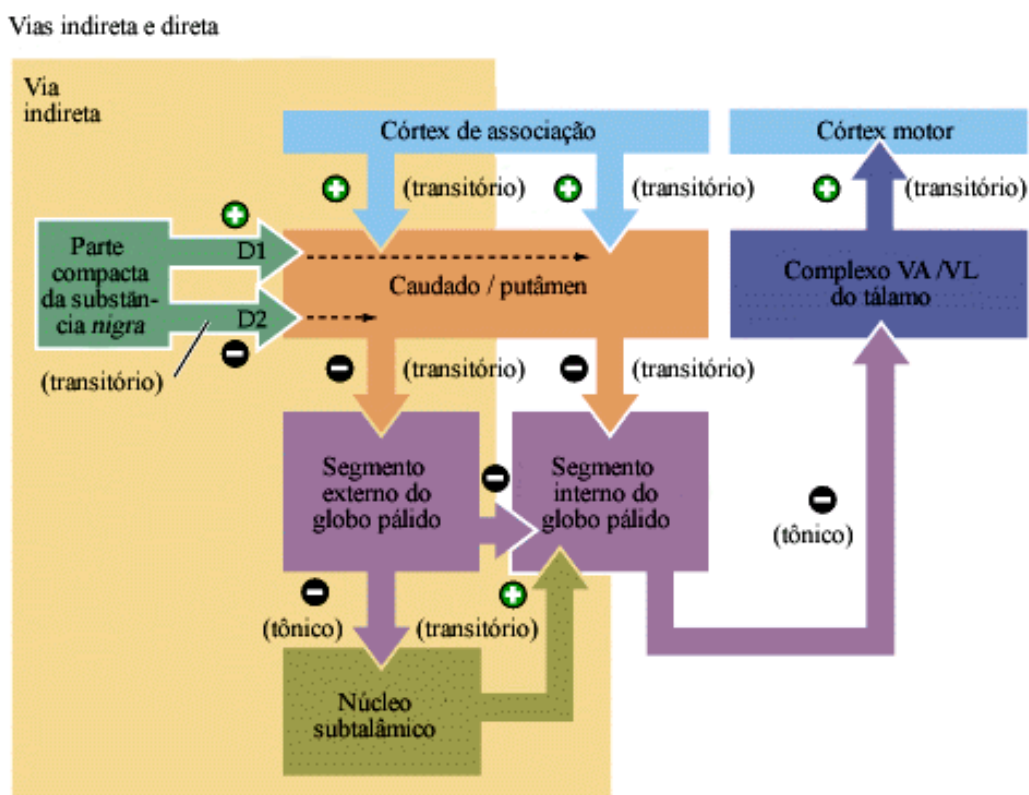


Fig. 2 - Desinibição das vias direta e indireta através dos núcleos da base. Na via direta, as conexões transitórias inibitórias do caudado e do putâmen projetam-se aos neurônios inibitórios tonicamente ativos do segmento interno do globo pálido (GPi), que, por sua vez, projeta-se ao complexo VA/VL, ao lado do tálamo. As aferências transitórias excitatórias ao caudado e ao

putâmen, oriundas do córtex e da substância negra, também são mostradas, bem como as aferências transitoriamente excitatórias do tálamo de volta ao córtex. Na via indireta (sombreada de amarelo), os neurônios inibitórios transitoriamente ativos do caudado e do putâmen projetam-se aos neurônios inibitórios tonicamente ativos do segmento externo do globo pálido (GPe). Observe que a influência da aferência dopaminérgica nigral é inibitória para os neurônios da via indireta. Os neurônios do GPe projetam-se ao núcleo subtalâmico, o qual também recebe uma intensa aferência excitatória do córtex. O núcleo subtalâmico projeta-se, por sua vez, ao GPi, onde sua influência transitoriamente excitatória atua opondo-se à ação desinibitória da via direta. Por este caminho a via indireta modula os efeitos da via direta (Modificado de: PURVES et al., 2005).

As influências modulatórias deste segundo circuito interno contribuem para a explicação de muitas das manifestações da doença de Parkinson. Como mencionado anteriormente, os efeitos normais da aferência da SNc ao estriado são a excitação dos neurônios espinhosos médios que se projetam diretamente ao GPi (a via direta) e a inibição dos neurônios espinhosos que se projetam às células do GPe (a via indireta). Portanto, ambos os efeitos dopaminérgicos servem para diminuir o efluxo inibitório dos NB e, assim, aumentar a excitabilidade dos neurônios motores superiores. Ao contrário, quando as células da SNc são destruídas, como ocorre na DP, o efluxo inibitório dos NB fica anormalmente alto e a ativação talâmica dos neurônios motores superiores do córtex motor fica mais difícil de ser obtida (Fig. 3; PURVES et al., 2005).

Muitos dos sintomas da DP refletem uma falha na desinibição normalmente mediada pelos NB. Assim, os pacientes parkinsonianos tendem a ter menos expressões faciais, ausência de movimentos associados, como o balanço dos braços durante a marcha, entre outros sinais e sintomas motores (PURVES et al., 2005).

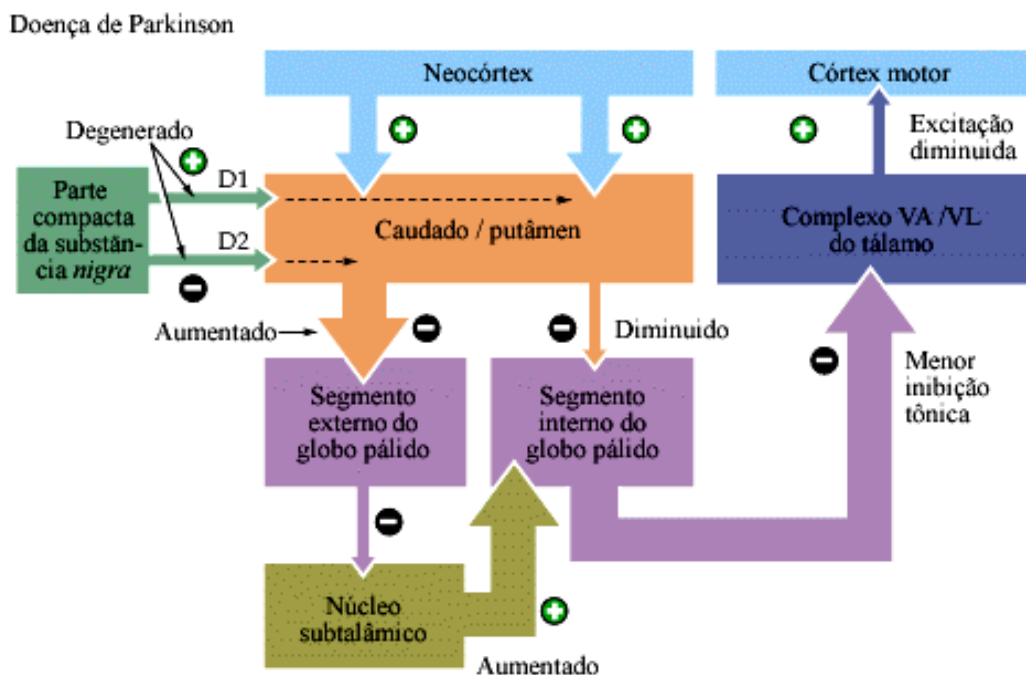


Fig. 3 - Na doença de Parkinson, as aferências fornecidas pela substância negra estão diminuídas (setas mais finas), tornando mais difícil para o caudado e putâmen gerarem a inibição transitória. Esta alteração na via direta resulta na manutenção da inibição tônica do GPi ao tálamo, dificultando a excitação talâmica do córtex motor (seta mais fina do tálamo ao córtex) (Modificado de: PURVES et al., 2005).

1.3 Genética da doença de Parkinson

Historicamente a DP era considerada como uma doença não-genética. Estudos em gêmeos eram inconsistentes com a hipótese de um componente genético, apesar de já terem sido observadas concentrações de casos em uma mesma família (MCINERNEY-LEO et al., 2005). Contudo, as novas descobertas na área da genética da DP trouxeram contribuições inestimáveis à compreensão da fisiopatologia da doença. Conforme observado por Farrer (2006), a DP, doença aparentemente não-genética, pode ser uma das primeiras a ser prevenida através da compreensão genética de suas causas moleculares.

Na última década, uma série de mutações foram descritas em famílias com DP, com um padrão mendeliano de herança. A identificação de várias formas monogênicas estabeleceram a DP como um distúrbio de movimento com uma origem genética considerável, em pelo menos um subgrupo de pacientes. Todas as formas monogênicas combinadas explicam apenas cerca de 20% dos casos de DP de início precoce e menos de 3% de início tardio (KLEIN, 2006). Quanto mais precoce a idade de início da DP, maior a probabilidade de que os fatores genéticos tenham um papel dominante. Apesar de relativamente incomuns dentro da população total de pacientes com DP, as formas genéticas da doença forneceram um caminho para estudo e identificação dos mecanismos que levam ao desenvolvimento da doença, não apenas nos casos genéticos, mas também nos esporádicos (WARNER; SCHAPIRA, 2003).

O ano de 1997 trouxe uma mudança no cenário caracterizado pela idéia de a DP ser uma doença “não-genética”. Polymeropoulos e cols. (1997) descreveram a primeira mutação em uma família de Contursi (Itália) com DP, no gene da alfa-sinucleína. Este achado, de importância considerável por si só, recebeu uma valorização adicional, quando no mesmo ano, um grupo de pesquisadores do Reino Unido conseguiu identificar justamente a alfa-sinucleína como o principal componente dos corpos de Lewy (SPILLANTINI et al., 1997, 1998). Dessa forma, o elo entre a genética e a fisiopatologia da doença lançou novas esperanças de finalmente se desvendar os mecanismos moleculares que levavam à DP. A esta descoberta inicial, se seguiram outras, de valor equivalente. Em um intervalo de menos de 10 anos, as descobertas de genes associados à DP cresceram de forma exponencial, a ponto que se torna difícil hoje falar sobre a DP sem se fazer referência aos aspectos genéticos da doença.

Até o momento 11 loci genéticos foram identificados na DP, tendo sido denominados PARK1 a PARK11. Dois desses 11 loci genéticos foram posteriormente descartados: a família originalmente mapeada como PARK4 na realidade mapeava como PARK1 e o PARK9 não é de fato um locus de DP. Dos nove loci remanescentes, foram identificados os seguintes genes: PARK1 - alfa-sinucleína, PARK2 - parkina, PARK5 - UCHL1, PARK6 - PINK1, PARK7 -DJ-1 e PARK8 - LRRK2. Certamente genes adicionais serão identificados em um futuro próximo, fornecendo novas peças ao “quebra-cabeça etiológico” da DP (MCINERNEY-LEO et al., 2005).

Apesar de somente uma pequena proporção dos casos de DP (estima-se que 10%) serem causados por mutações genéticas com alta penetrância, a identificação destes genes teve um impacto significativo na compreensão dos mecanismos que determinam a degeneração dopaminérgica (ZIMPRICH et al., 2004). Esses mecanismos envolvem a agregação de proteínas, déficit de degradação de substratos pelo sistema ubiquitina-proteassoma, disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, temas que serão abordados no próximo tópico. Além disso, como tanto anseiam os pacientes, espera-se que, em médio ou longo prazo, a estas descobertas genéticas corresponda um avanço em termos de estratégias terapêuticas para a doença.

1.4 Fisiopatologia da doença de Parkinson

Apesar de ainda não se ter pleno conhecimento dos processos que ocasionam o desenvolvimento da DP, muito se avançou neste sentido nos últimos

anos. A partir das descobertas genéticas, estudos epidemiológicos, investigações neuropatológicas e modelos experimentais mais fidedignos. Atualmente, acredita-se que a DP decorra de alterações mitocondriais, na via de processamento de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma (a agregação de proteínas é uma característica patológica consistente de doenças neurodegenerativas e seu dobramento é fundamental para a função normal das mesmas) e de estresse oxidativo, que culminam com a agregação e depósito de alfa-sinucleína nos corpos de Lewy, os quais são inclusões citoplasmáticas eosinófilas nos neurônios dopaminérgicos remanescentes, sendo a característica neuropatológica mais marcante da DP (AGOROGIANNIS et al., 2004; VALENTE et al., 2004). Spillantini e cols. descreveram em 1997 que os corpos de Lewy se marcavam fortemente com anticorpos para alfa-sinucleína, concluindo que a mesma devia ser o principal componente dos corpos de Lewy na DP.

O próprio metabolismo da dopamina pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio, expondo particularmente os neurônios dopaminérgicos nigrais, e o estresse oxidativo resultante pode, além de exercer efeitos sobre a integridade celular, promover o dobramento inadequado de proteínas e exacerbar a agregação de alfa-sinucleína no citoplasma (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002). A inibição do complexo I mitocondrial também pode afetar o sistema ubiquitina-proteassoma, aparentemente por gerar espécies reativas de oxigênio que causam dano oxidativo a proteínas, talvez incluindo componentes do proteassoma (GREENAMYRE; HASTINGS, 2004). O estresse oxidativo também potencializa a agregação e a toxicidade da alfa-sinucleína 10, especialmente na presença de dopamina (EBLAN; WALKER; SIDRANSKI, 2005).

Em resumo, os inibidores de proteassoma lesam a mitocôndria e as toxinas mitocondriais levam à lesão do proteassoma, diretamente ou reduzindo o ATP necessário para a função normal do sistema ubiquitina-proteassoma. Tanto a disfunção mitocondrial como a do sistema ubiquitina-proteassoma podem levar a, ou ser, causados por estresse oxidativo (Fig. 4) (SHAPIRA, 2006).

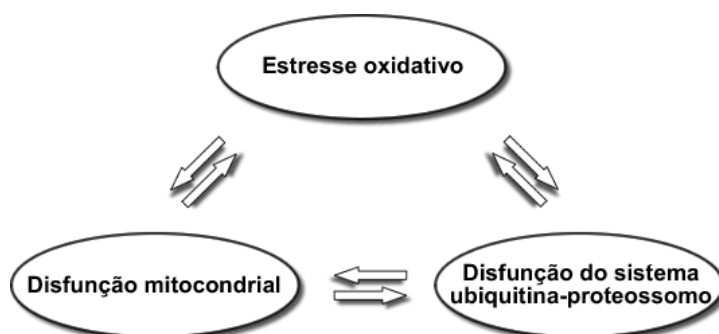


Fig. 4 – Inter-relação entre os processos celulares associados à patogênese da DP.

1.5 Modelos animais da doença de Parkinson

As desordens neurológicas em humanos podem ser estudadas em animais através da utilização de procedimentos padronizados que recriem eventos patogênicos específicos e resultados comportamentais (SCHOBER, 2004).

A patologia da doença de Parkinson tem sido extensivamente estudada em modelos animais com a utilização de neurotoxinas que causam dano seletivo aos neurônios dopaminérgicos como o MPTP ou a 6-hidroxidopamina (6-OHDA). A administração intracerebral de 6-OHDA pode causar um dano fatal nos terminais dopaminérgicos estriatais, axônios nigro-estriatais dopaminérgicos e corpos celulares dopaminérgicos na substância negra (PRZEDBORSKI et al., 1995; BOVÉ et al., 2005).

Através de modelos animais, a deficiência de dopamina estriatal foi associada aos sintomas da doença de Parkinson e a levodopa (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina ou L-dopa) foi o primeiro fármaco a ser utilizado para compensar a perda de dopamina no estriado. Além disso, a patogênese da DP ainda não está completamente esclarecida, assim, a utilização de modelos animais tem grande importância para melhor compreender a patogênese desta doença e descobrir novas terapias para tratá-la (BETARBET; SHERER; GREENNAMYRE, 2002).

Ratos com denervação dopaminérgica unilateral severa mostraram anormalidades sensório-motora, incluindo movimentos circulares espontâneos ipsilateral (UNGERSTEDT, 1971), prejuízos no uso do membro contralateral (SCHALLERT et al., 2000; TILLERSON et al., 2001) e negligência contralateral (MARSHALL; TURNER; TEITELBAUM, 1971; ALTAR; O'NEIL; MARSHALL, 1984).

Recentemente, foi descoberto que produtos químicos utilizados na agricultura, como a rotenona, *maneb* e *paraquat*, quando administrados sistemicamente, também podem induzir características específicas da doença de Parkinson (BETARBET; SHERER; GREENNAMYRE, 2002).

1.5.1 6-Hidroxidopamina

A 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) é um análogo hidroxilado do neurotransmissor dopamina (Fig. 5) e representa uma das mais comuns neurotoxinas utilizadas nos modelos de neurodegeneração das projeções catecolaminérgicas centrais, incluindo o sistema nigro-estriado, *in vivo* e *in vitro* (BLUM et al., 2001).

A toxicidade induzida pela 6-OHDA é relativamente seletiva para os neurônios catecolaminérgicos, resultando de uma captação preferencial da mesma pelas

moléculas transportadoras de dopamina e noradrenalina (LUTHMAN et al., 1989). Dentro do neurônio, a 6-OHDA acumula-se no citosol e induz a morte celular sem características apoptóticas (JEON; JACKSON-LEWIS; BURKE, 1995), tal dano pode ser explicado pela ação tóxica da 6-OHDA ao complexo I mitocondrial da cadeia de transferência de elétrons, o que leva a formação de radicais livres superóxido (BETARBET; SHERER; GREENNAMYRE, 2002). Interessantemente, foi encontrada um acúmulo de 6-OHDA endógena em pacientes acometidos pela doença de Parkinson (ANDREW et al., 1993).

A 6-OHDA não tem a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, portanto, deve ser injetada através de procedimentos estereotáxicos diretamente no encéfalo. Os sítios de administração preferenciais são a substância negra, o feixe prosencefálico medial e o estriado (PERESE et al., 1989; PRZEDBORSKI et al., 1995). Após a infusão da 6-OHDA na substância negra ou no feixe prosencefálico medial, a degeneração dos neurônios dopaminérgicos começa em 12 horas e a depleção dos níveis de dopamina no estriado ocorre entre 2 ou 3 dias (FAULL; LAVERTY, 1969). Interessantemente, a injeção intra-estriatal de 6-OHDA causa uma morte neuronal mais progressiva, induzida retrogradamente, quando comparada com a administração no complexo substância negra/área tegmental ventral (BERGER; PRZEDBORSKI; CADET, 1991).

A magnitude da lesão depende da quantidade de 6-OHDA injetada, do sítio escolhido e da espécie utilizada (BETARBET; SHERER; GREENNAMYRE, 2002). Em camundongos, ratos, gatos e primatas, a 6-OHDA é uma toxina altamente efetiva para os neurônios dopaminérgicos (BEAL, 2001).

A lesão bilateral com 6-OHDA induz, em parte, sintomas motores parkinsonianos. Entretanto, este tipo de modelo não tem sido freqüentemente

utilizado devido ao fato de que os animais necessitam de maiores cuidados após o procedimento (CENCI; WHISHAW; SCHALLERT, 2002).

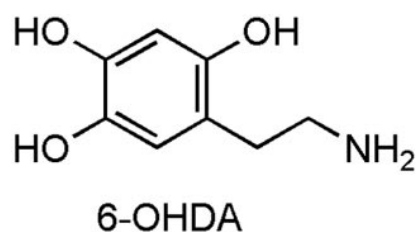


Fig. 5 – Estrutura da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina.
(Adaptado de: PRZEDBORSKI; ISCHIROPOULOS, 2005).

1.6 A proteína glial fibrilar ácida (GFAP)

No sistema nervoso central (SNC) há dois tipos de células gliais: a macroglia, constituída dos astrócitos, oligodendrócitos e células ependimais e a microglia. Dentre as células gliais, os astrócitos são as que estão presentes em maior número. Os astrócitos liberam fatores neurotróficos e citocinas, orientam o desenvolvimento neuronal, direcionam o crescimento dos axônios, regulam o metabolismo dos neurotransmissores e os níveis de íons extracelulares (DONG; BENVENISTE, 2001).

A GFAP é a principal proteína de filamentos intermediários de 8-9 nm de diâmetro em astrócitos maduros no SNC, apresentando a função de modular a estabilidade estrutural dos processos astrocíticos. Além disso, é considerada como marcador específico para astrócitos maduros (ENG; GHIRNIKAAR; LEE, 2000). A GFAP apresenta uma atividade dinâmica modulada por fosforilação e desfosforilação, efetuando um papel fundamental na plasticidade astrocítica

(RODNIGHT et al., 1997). Seu estado de fosforilação é regulado, dentre outros fatores, pela proteína S100B (ZIEGLER et al., 1998).

A necessidade de alterações morfológicas que é característica dos astrócitos, a translocação de organelas, o transporte de vesículas e a divisão celular são apenas algumas situações em que o citoesqueleto sofre reorganização. Os filamentos intermediários, assim como os demais constituintes do citoesqueleto celular, estão constantemente respondendo a diferentes estímulos externos alterando seu estado de polimerização (ENG; GHIRNIKAAR; LEE, 2000).

Os filamentos intermediários gliais no período pré-natal são formados quase exclusivamente por vimentina e após o nascimento a GFAP tem sua expressão aumentada e substitui a vimentina no animal adulto (LIEDTKE et al., 1996). A expressão de GFAP é essencial para a arquitetura normal da substância branca e a integridade da barreira hematoencefálica (LIEDTKE et al., 1996). Portanto a expressão de GFAP é de fundamental importância na maturação do SNC e na manutenção do funcionamento das funções encefálicas normais.

A GFAP foi originalmente descoberta em casos de esclerose múltipla, doença caracterizada por desmielinização intensa, gliose reativa e formação de cicatrizes compostas de axônios expostos circundados por astrócitos repletos de filamentos gliais (ENG; GHIRNIKAAR; LEE, 2000).

No SNC de vertebrados superiores, seguidos de lesão resultante de trauma, doença, desordem genética ou insulto químico, os astrócitos tornam-se reativos e respondem de uma maneira típica, denominada astrogliose, caracterizada pela rápida síntese de GFAP, proliferação e/ou hipertrofia glial. Em nível molecular esta gliose reativa é demonstrada por um aumento na expressão de GFAP (ENG; GHIRNIKAAR; LEE, 2000; HAUSMANN et al., 2000; HERMANN et al., 2000).

Entretanto, um aumento no conteúdo de GFAP não é observado apenas em condições patológicas, pois em astrócitos normais isto ocorre gradualmente durante o curso da vida em camundongos, ratos e humanos (DAHL, 1976; NICHOLS et al., 1993).

A gliose reativa ocorre em qualquer tipo de insulto ao SNC, mas a região anatômica, severidade da gliose e seqüência de desenvolvimento temporal varia entre doenças tais como a esclerose lateral amiotrófica e as doenças de Gertmann-Straussler, Huntington, Wilson, Pick, Parkinson, Alzheimer e Down, assim como nas desordens convulsivas, em razão formação de cicatrizes no córtex após morte neuronal devido à excitotoxicidade (ENG; GHIRNIKAAR; LEE, 2000).

1.6.1 GFAP na doença de Parkinson

Embora as mutações genéticas tenham sido relacionadas ao desenvolvimento da DP, reconhece-se que fatores adicionais podem somar-se à progressão do processo neurodegenerativo. Neste contexto, a gliose reativa, a qual é encontrada em modelos experimentais, bem como em muitos pacientes acometidos pela DP mas não em todos, sugere que este fenômeno esteja envolvido na patogênese da doença (FORNO et al. 1992; SHENG et al., 1993).

Após infusão unilateral de 6-OHDA na substância negra compacta, estudos imunoistoquímicos mostraram que o número de astrócitos imunorreativos para GFAP no estriado aumentou significativamente 1 dia após à lesão e atingiu o valor máximo e com imunoreatividade intensa aos 4 dias da lesão. O número de células GFAP positivas gradualmente declinou, entretanto foi ainda 1.7 vezes maior que o valor controle 28 dias após à lesão. Estes resultados suportam a hipótese de que produtos liberados por neurônios lesionados são responsáveis pela indução da

gliose reativa, entretanto, não se pode distinguir se este efeito é mediado diretamente pelos astrócitos ou indiretamente por outras células como a microglia (SHENG et al. 1993). Estes achados estão de acordo com outros trabalhos que encontraram uma resposta astrocitária após a infusão de 6-OHDA no sistema nigroestriatal (GORDON et al. 1997; PASINETTI et al. 1999; RODRIGUES et al. 2001).

A quantidade de astrócitos GFAP positivos correlaciona-se inversamente com a quantidade de células dopaminérgicas mortas, sugerindo que os neurônios dopaminérgicos localizados em áreas com poucos astrócitos são mais suscetíveis ao processo degenerativo (DAMIER et al., 1993). Além disso, os astrócitos particularmente respondem a citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e acredita-se que estas citocinas participem da ativação astrocitária desencadeada após lesões ao SNC (GIULIAN et al., 1988).

1.7 Exercício físico

Apesar das considerações iniciais em contrário, uma crescente quantidade de evidências sugere que o encéfalo possui uma considerável capacidade para se auto-reparar e esta capacidade pode ser promovida através do exercício físico (SMITH; ZIGMOND, 2003).

Atualmente muitas evidências indicam que fatores relacionados ao estilo de vida, como a prática de atividade física por exemplo, podem afetar de forma positiva o aprendizado e a memória, atrasar o declínio cognitivo relacionado à idade, reduzir

o risco de neurodegeneração e também ajudar no tratamento da depressão. Tanto estudos em humanos como em animais de experimentação têm demonstrado que o exercício físico afeta muitos aspectos da função encefálica bem como possui amplos efeitos na saúde do sistema nervoso. A partir de diferentes pesquisas, está cada vez mais claro que estes efeitos centrais são dependentes da regulação de fatores de crescimento periféricos e centrais regulados pelo exercício físico, como o fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF), fator de crescimento da insulina do tipo 1 (IGF-1) e fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF) (COTMAN; BERCHTOLD; CHRISTIE, 2007).

1.7.1 Exercício físico em pacientes com doença de Parkinson

Programas de exercício físico podem ser uma estratégia efetiva para atrasar ou mesmo reverter o declínio funcional em pessoas afetadas pela DP e uma grande quantidade de evidências empíricas tem emergido nos últimos anos.

Estudos clínicos realizados com pacientes portadores da DP relataram benefícios induzidos pelo exercício como aumento nas habilidades motoras, função cognitiva, ânimo e na realização de atividades de vida diária (PALMER et al., 1986; BAATILE et al., 2000; MIYAI et al., 2000; NIEUWBOER et al., 2001).

Em trabalho realizado em 2002, pacientes portadores da DP foram submetidos a um treinamento aeróbico durante 16 semanas. Após este período, foram analisados o pico de consumo de oxigênio (VO_2) e o tempo para o início do movimento. O VO_2 aumentou 26% indicando que os pacientes com DP podem se beneficiar do exercício tanto como a população normal. O tempo para o início do movimento foi reduzido de 285 ms para 261, sugerindo que o exercício é capaz de

melhorar a habilidade de iniciar o movimento e também a execução correta de padrões de movimento (BERGEN et al., 2002).

O período total de treinamento, a intensidade e o tipo de exercício físico escolhido para tratar os pacientes com DP variam entre os grupos de pesquisadores, embora a maioria escolha por caminhadas. Por exemplo, um programa de treinamento de caminhada na esteira por 6 semanas, com sessões de 30 min, 4 vezes por semana e progressão gradual da intensidade melhorou a qualidade de vida dos pacientes de 32 para 22 pontos, avaliada através do “The 39-item Parkinson’s Disease Questionnaire” (PDQ-39). Além disso, a velocidade da marcha usual aumentou de 1.11 para 1.26 m/s, indicando que o exercício físico pode atuar diretamente sobre o sintoma da bradicinesia na DP (HERMAN et al., 2007).

Recentemente, Goodwin e cols (2008) sistematicamente revisaram 14 ensaios randomizados, reportando sobre a eficácia da intervenção do exercício em variáveis como o estado físico, psicológico e social, além da qualidade de vida em pessoas com DP. Os autores encontraram indícios que apóiam o exercício físico como sendo benéfico para a função física, qualidade de vida, força muscular, equilíbrio e velocidade da marcha em pacientes com DP. Esta revisão encontrou evidências dos benefícios potenciais do exercício para pessoas acometidas pela doença, embora os autores sugiram que é necessário realizar mais estudos de boa qualidade.

Estes dados estão de acordo com outro trabalho de revisão publicado por Crizzle e Newhouse (2006), no qual os autores avaliaram 7 estudos sobre o efeito de diferentes modalidades de exercício, físico ou terapêutico, em pacientes com PD. Os trabalhos revisados indicaram que o exercício é capaz de melhorar características como rotação axial, flexibilidade, equilíbrio, força muscular e

mobilidade, enfatizando a hipótese de que pacientes com DP melhoram a performance física e atividades de vida diária através do exercício.

1.7.2 Exercício físico em modelos da doença de Parkinson

Estudos em modelos animais da doença de Parkinson têm sido realizados para avaliar os efeitos da atividade física tanto na funcionalidade das patas dianteiras, como nas repercussões no SNC. Alguns resultados dos diferentes trabalhos investigando os efeitos do exercício físico em ratos submetidos a modelos de DP divergem quanto à associação entre recuperação funcional e melhora nos déficits neuroquímicos, ora ocorrendo conjuntamente, como também, isolados.

Ratos com lesão unilateral por 6-OHDA submetidos a um regime de exercício voluntário e exercício voluntário associado a exercício forçado, apresentaram uma recuperação funcional das patas dianteiras mais precoce que o grupo de ratos sedentários. Entretanto, os grupos exercitados não apresentaram sinais de neuroproteção na substância negra (avaliada através de técnica imunistoquímica para a enzima tiroxina hidroxilase) e no estriado (avaliado através da técnica de *binding* para o transportador de dopamina) (O'DELL et al., 2007).

Outro estudo, utilizando um protocolo de treinamento de 2 x 20 min/dia, durante 30 dias, encontrou uma redução na depleção de dopamina estriatal nos animais lesionados por 6-OHDA e treinados quando comparados ao grupo sedentário. Entretanto, o protocolo de treinamento utilizado neste estudo não produziu diferenças na maioria dos déficits comportamentais entre ambos os grupos (POULTON; MUIR, 2005).

Os modelos de lesão bilateral com MPTP em camundongos e de lesão unilateral com 6-OHDA em ratos, o exercício forçado (corrida na esteira) induziu

recuperação funcional dos membros anteriores e atenuou os déficits neuroquímicos (TILLERSON et al., 2003).

Através do uso forçado do membro anterior (engessamento da pata não afetada, obrigando o uso da afetada), ratos submetidos à lesão unilateral com 6-OHDA não apresentaram prejuízo detectável no uso do membro anterior ou uso assimétrico. Estes animais também mostraram uma notável reserva de dopamina estriatal e seus metabólitos e, também, na expressão do transportador vesicular de monoaminas, o que sugere uma redução da degeneração dos neurônios dopaminérgicos (TILLERSON et al., 2001). Em 2003, este mesmo grupo de pesquisadores sugeriram que os efeitos benéficos do uso forçado do membro afetado envolveria a participação do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF). Neste trabalho, os animais (ratos) tiveram a pata que não seria afetada pela lesão por 6-OHDA imobilizada por 7 dias antes da lesão, obrigando, deste maneira, ao uso forçado prévio da pata que seria afetada. Os animais que foram imobilizados não apresentaram comportamento assimétrico no uso das patas dianteiras, mensurado nos dias 14 e 28 pós-lesão e uma marcada atenuação na perda de dopamina estriatal e seus metabólitos no dia 30. Além disso, estes animais apresentaram um aumento nos níveis de GDNF no estriado correspondente a pata que estava livre para a movimentação, o que sugere um efeito neuroprotetor do GDNF (COHEN et al., 2003).

1.8 Justificativa

Como mencionado anteriormente, os astrócitos respondem a diferentes tipos de lesões ao SNC, entre estas a doença de Parkinson. Esta resposta astrocitária é conhecida como gliose reativa, e serve para manter a homeostasia, ou até mesmo melhorar as funções deste sistema.

Por outro lado, o exercício físico desencadeia respostas benéficas sobre no SNC, tanto em condições normais como patológicas. A maioria destas respostas parece ser mediada por diferentes fatores neurotróficos regulados direta ou indiretamente através do exercício.

Entretanto, os exatos mecanismos pelos quais o exercício desempenha estas funções continua sendo alvo de pesquisas. Particularmente na doença de Parkinson, não foram encontrados trabalhos avaliando os efeitos do exercício físico sobre a expressão de GFAP em animais submetidos ao modelo de DP induzida por 6-OHDA.

Portanto, este trabalho poderá somar-se ao demais previamente publicados, com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre como o exercício desencadeia seus efeitos neste modelo de DP.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de um protocolo de exercício físico na expressão da proteína GFAP no estriado dorsal e, também, em parâmetros do comportamento motor de ratos submetidos ao modelo de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA.

1.9.2 Objetivos específicos

- Mensurar os efeitos do exercício físico através da densitometria óptica para tirosina hidroxilase na substância negra compacta de ratos submetidos à lesão dopaminérgica por 6-OHDA.

- Quantificar o número de rotações induzidas por metilfenidato em ratos lesionados por 6-OHDA sedentários e exercitados.

- Avaliar parâmetros do comportamento motor como tempo de início e tempo total de caminhada através da barra estreita em ratos lesionados por 6-OHDA sedentários e exercitados.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos adultos (*Wistar*), com idades entre 03 e 04 meses e peso de aproximadamente 300 g, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram tratados conforme a Lei número 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica. Os animais foram mantidos em caixas padrão do biotério, recobertas por maravalha e receberam ração e água “*ad libitum*”, permanecendo em ciclo de claro/escuro 12 h, sob temperatura ambiental controlada (20 ± 1 °C). Durante o experimento, todos os esforços foram feitos para reduzir o número de animais usados e para minimizar qualquer estresse ou desconforto.

2.2 Grupos experimentais

Os animais foram randomicamente divididos nos seguintes grupos experimentais:

Grupo 01: ratos falso-operados (*Sham*), sedentários (SS, n=7);

Grupo 02: ratos falso-operados (*Sham*), submetidos ao programa de exercício físico (treinados) (ST, n=8);

Grupo 03: ratos com lesão unilateral induzida por 6-OHDA, sedentários (LS, n=8);

Grupo 04: ratos com lesão unilateral induzida por 6-OHDA, submetidos ao programa de exercício físico (treinados) (LT, n=8).

2.3 Indução do modelo experimental

2.3.1 Lesão induzida por 6-OHDA

Ratos com pesos entre 300-350 g no dia da cirurgia (Dia 0) foram anestesiados com equitesina (25 mg/kg de pentobarbital (P3761, Sigma) e 150 mg/kg de hidrato de cloral (C8383, Sigma) via i.p.) seguido da administração de sulfato de atropina (0,1 mg/kg, via i.p.) (A0257, Sigma) para facilitar a respiração, antes dos animais serem colocados no aparato estereotáxico (Insight, Brasil). Foi realizada uma incisão no integumento e um pequeno orifício no crânio dos animais, com o auxílio de uma broca cirúrgica (Insight, Brasil), para a infusão unilateral de 6-OHDA (10 µg/3µL) (H8523, Sigma), neurotoxina seletiva para os neurônios catecolaminérgicos, no feixe prosencefálico medial (0,5 µL/mim), de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas: 3,3 mm posterior e 1,8 mm ao bregma e 8,1 mm ventral a dura. Foi utilizada como o veículo para a 6-OHDA uma solução de 0,9% de salina estéril contendo 0,02% de ácido ascórbico. A neurotoxina foi infundida usando uma micro-bomba (Insight, Brasil) conectada a uma seringa Hamilton (10 µL) anexada a uma agulha gengival 32G. A agulha foi deixada em cada sítio da infusão por 2 mim para permitir a difusão da neurotoxina.

Após a cirurgia foi colocada uma resina acrílica para o fechamento do pequeno orifício no crânio e o integumento suturado. Os animais foram colocados

em uma incubadora para prevenir a hipotermia até que o efeito do anestésico passasse. Todos os procedimentos foram realizados com o máximo de zelo para evitar o estresse e o sofrimento dos animais.

2.3.2 Grupo falso-operado (*Sham*)

Este grupo de animais recebeu todos os procedimentos cirúrgicos padrões da cirurgia aplicada aos animais do grupo lesionado com 6-OHDA. Entretanto, foi infundida apenas o mesmo volume do veículo utilizado no grupo lesionado. Foram tomados todos os cuidados pós-operatórios citados acima.

2.4 Teste do esforço máximo

O teste do esforço máximo (TEM) foi utilizado para determinar a capacidade (velocidade) máxima de exercício (CME). Três dias antes da cirurgia, todos os animais foram adaptados em uma esteira durante 10 min em uma velocidade de 5 m/min. Dois dias após a cirurgia os animais foram submetidos ao TEM. O teste consistiu de uma corrida graduada na esteira, com incremento na velocidade de 5 m/min a cada 3 min, começando em 5 m/min e continuando até a CME de cada rato (adaptado de: MELO; MARTINHO e MICHELINI, 2003). Os valores obtidos no TEM, foram usados para planejar o programa de treinamento na esteira. O TEM foi repetido no final do período de treinamento para avaliar a eficácia do treinamento e também os efeitos da lesão induzida por 6-OHDA na CME.

2.5 Treinamento na esteira

O treinamento, o qual iniciou dois dias após a cirurgia, foi realizado em uma esteira para humanos (Runner, Brazil) adaptada para o uso com ratos. Este programa de treinamento consistiu de uma caminhada na esteira por 20 min no primeiro dia, seguindo de um aumento progressivo todos os dias, até o limite de 50 min no 5º dia e, finalmente, com uma duração de 60 min nas próximas 4 semanas. Cada sessão na esteira foi constituída de um período inicial de aquecimento de 5 min, em 30% da velocidade máxima (CME) alcançada no MET, 10-50 min de caminhada em 45-50% e um período de recuperação de 5 min em 30%. Foram realizadas 5 sessões por semana, uma vez por dia. O período total de treinamento na esteira foi de 4 semanas (adaptado de: Van Meeteren et al., 1997).

2.6 Rotação induzida por metilfenidato

Os animais foram injetados com metilfenidato (40 mg/kg, i.p; Ritalina®, Novartis, Brasil) 22 dias após a cirurgia. Imediatamente após, cada rato foi individualmente colocado em um cilindro transparente (240 mm de diâmetro, 300 mm de altura) e filmado por 30 min com uma câmera digital (Sony 5.0, Brasil). O número de rotações ipsilateral à lesão foi determinado (adaptado de: Silvestrin *et al.*, 2008).

2.7 Narrow beam test

A barra estreita usada no presente experimento tinha 105 cm de comprimento, 4 cm de espessura e 3 cm de altura. A barra foi suspensa 80 cm do solo através de suportes de madeira colocados em suas extremidades (Fig. 6)

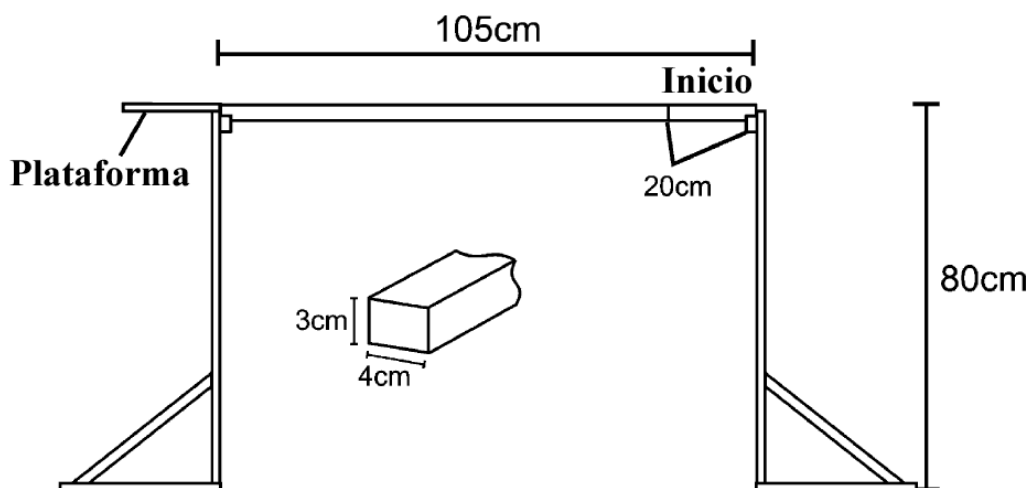


Fig. 6 – Diagrama ilustrativo do aparelho utilizado para a realização do *narrow beam test* (adaptado de: ALLBUTT e HENDERSON, 2007).

Na extremidade inicial da barra foi colocada uma plataforma, onde os animais eram colocados para o início da travessia e foi realizada uma marca de 20 cm a partir desta extremidade. Na outra extremidade foi colocado um esconderijo escuro para onde os animais caminhavam. Abaixo da barra (1m) foi colocada uma ampla estopa de espuma, aproximadamente com 12 cm de espessura, para prevenir lesões aos animais em causa de queda.

Durante o teste, cada rato era colocado na extremidade de início de barra, de frente para o esconderijo escuro. Após serem liberados da plataforma inicial, os animais andavam/corriam em direção ao abrigo. Após passarem a marca inicial de 20 cm com as patas posteriores o tempo era registrado, pois foi considerado como o tempo para o início da travessia (latência), a qual pode ser um preditor de acinesia

em ratos parkinsonianos. Também foi mensurado o tempo total para a travessia da barra, como indicativo de bradicinesia em animais parkinsonianos, mensurado a partir da liberação do animal sobre a barra até atingir a entrada com as patas traseiras no esconderijo escuro. Cada dia de teste consistiu de três tentativas na barra, e um dia antes de cada dia de teste os animais foram adaptados a realizar a travessia na barra com três tentativas livres de travessia por animal (Adaptado de: ALLBUTT e HENDERSON, 2007).

2.8 Imunoistoquímica

Após o fim do período experimental, os animais foram profundamente anestesiados com equitesina (pentobarbital, 25 mg/kg, i.p.; Cristalia, Brasil e hidrato de cloral, 150 mg/kg, i.p.; Sigma, C8383), injetados com 1000 UI de heparina e foram perfundidos transcardiacamente com 150 ml de solução salina, seguido de 4% de paraformaldeído (Reagen, Brasil) diluído em tampão fostato 0,1M (TF, pH 7.4) em temperatura ambiente. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos do crânio, pos-fixados na mesma solução a temperatura ambiente por 4 horas e crioprotetidos através da imersão em soluções crescentes de sacarose (15 e 30%) em TF (4°C) até afundarem. Após, os encéfalos foram congelados através de uma breve imersão em isopenteno (Reagen, Brasil) e, em seguida, em nitrogênio líquido (Reagen, Brasil) e guardados em um congelador (-70°C) para posterior análise.

Cortes seriados (40 µm) foram obtidos em criostato (Leica, Alemanha) em -20°C e coletados em TF 0,1M, NaCl 0,9%, pH 7,4 (tampão fosfato-salina -TFS). Para o procedimento imunoistoquímico, os cortes (free-floating) foram pré-tratados em 3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 30 min, cuidadosamente lavados e

bloqueados com albumina sérica bovina (ASB) 2% diluída em TFS contendo Triton X-100 0,3% (TFS-Tx, Sigma) por 30 min e incubados com os anticorpos de escolha (TH ou GFAP).

Para a imunistoquímica realizada para TH, cortes da SNpc (-4,8 a -5,80mm a partir do bregma, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson, 1998) foram incubados em anticorpo monoclonal anti-TH produzido em camundongo diluído em TFS-Tx (1:750) por 48 h em 4°C. Após várias lavagens, os cortes foram incubados em anti IgG produzido em camundongo conjugado com peroxidase anti-peroxidase, diluída 1:300 em TFS a temperatura ambiente por 2 h.

Além disso, para realizar a detecção para GFAP, cortes do estriado dorsal (1,7 a -0,26mm a partir do bregma, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson, 1998) foram incubados em anti-corpo policlonal anti-GFAP produzido em coelho (Sigma, EUA), diluído 1:150 em TFS-Tx por 48 h em 4 °C. Após várias lavagens, os cortes foram incubados em anti IgG (produzida em coelho, Sigma, EUA) conjugada com complexo diluída 1:50 em TFS em temperatura ambiente por 2 h.

A reação imunistoquímica foi revelada através da incubação dos cortes em solução contendo 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma, EUA) 0,06% dissolvida em TFS por 10 min e então, na mesma solução contendo 1 µM de H₂O₂ 3% por milímetro de DAB média por aproximadamente 10 min. Após, os cortes foram lavados em TFS, desidratados em etanol, diafanizados com xileno e cobertos com Entellan e lamínulas. Os cortes controles foram preparados omitindo-se o anti-corpo primário (TH ou GFAP).

Os encéfalos dos animais foram fixados e pós-fixados pelo mesmo período em soluções idênticas e rigorosamente processados ao mesmo tempo; os cortes foram incubados pelo mesmo período de tempo. Estas precauções foram tomadas

para evitar super-reação, diferenças na reação cromógena, saturação na densidade óptica e mudanças nos níveis de fundo. Observe que a DAB pode ser carcinogênica, e por esta razão, o procedimento precisa ser realizado cuidadosamente em uma câmara com fluxo de ar laminar e com uso de luvas. Após, toda vidraria e outros equipamentos expostos à solução de DAB foram tratados, pelo menos 24h, com solução de hipoclorito de sódio 10% e cuidadosamente lavados com água. Em caso de contato, a pele deve ser imediatamente enxaguada com água (XAVIER et al., 2005).

2.9 Análise das imagens

Para cada animal, 10 imagens em formato TIF do lado lesionado (hemisfério esquerdo – aumento de 200x) da SNpc e do estriado dorsal foram obtidas com microscópio de luz (Nikon E600) acoplados a uma Câmera Digital USB 2.0 Eyepiece (DCE-2, China). As imagens foram analisadas com o programa ImageJ 1.40 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Para isso, as imagens coloridas em RGB (*red, green and blue* - 640x480 pixels, 24-bits) foram convertidas para escala de cinza (8-bits). Todas as condições de iluminação e aumento foram mantidas constantes e o experimentador não tinha conhecimento sobre os grupos de animais. Para a correção do fundo, uma imagem de referência foi capturada de um campo vazio e utilizada para divisão de cada imagem experimental pelo aplicativo acessório (chamado *plugin*, em linguagem Java, pode ser incorporado por *download* gratuitamente ao programa original) “Calculator Plus” do programa ImageJ. A equação de divisão utilizada é:

Pixel a ser corrigido = (valor do pixel da imagem experimental : valor do pixel na mesma localização da imagem de referência) x densidade óptica média dos pixels da imagem de referência

Tal equação é uma simplificação, utilizando-se valor absoluto de preto (igual a zero), a partir de:

$$1 \quad C_{lx,y} = [(I_{lx,y} - \text{preto} : R_{lx,y} - \text{preto}) \times (M - \text{preto})] + \text{preto}$$

Onde $C_{lx,y}$ = pixel da imagem corrigida na no local (x,y);

$I_{lx,y}$ = pixel da imagem experimental no local (x, y);

$R_{lx,y}$ = pixel da imagem de referência (x, y);

M = valor médio dos pixels da imagem de referência (neste caso = 125);

Preto = intensidade de cinza quando nenhuma luz atravessa o material experimental, neste caso = 0 (0–255).

Áreas de interesse retangular (ADI) foram aplicadas nas imagens da SNpc (ADI = 480x220 pixels) e do estriado dorsal (ADI = 450x20 pixels). As densidades ópticas para cada ADI foram medidas na forma de densidade óptica não-calibrada [$10/\log(255/255 - \text{valor do pixel})$]. A coloração de fundo foi subtraída das medidas da densidade óptica usando os valores médios dos cortes de tecido onde o anti-corpo primário foi omitido (Xavier et al., 2005).

2.10 Análises estatísticas

Os dados (capacidade máxima de exercício e parâmetros avaliados no *narrow beam test*) foram analisados utilizando a análise da variância de duas vias para medidas repetidas (ANOVA; n = 7-8 ratos por grupo). As variáveis independentes foram a lesão por 6-OHDA e o treinamento na esteira, e o tempo (dias de avaliações), a medida repetida.

Os demais dados (densidade óptica para TH e GFAP e rotações induzidas por metilfenidato) foram analisados pela ANOVA de duas vias.

Todas as análises foram seguidas pelo teste *post-hoc Fisher's Least Significant Difference (LSD)*. Os dados foram expressos como média±erro padrão da média. Diferenças menores que 5% foram consideradas significativas. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa *Statística*.

3. RESULTADOS

3.1 Artigo a ser publicado:

- Márcio Ferreira Dutra, Simone Marcuzzo, Mariane Jaeger, Jocemar Ilha, Pedro Ivo Kalil-Gaspar, Matilde Achaval. **Exercise improves motor behavioral deficits and induces GFAP expression in 6-OHDA model of Parkinson's disease.**

**Exercise improves motor behavioral deficits and induces GFAP
expression in 6-OHDA model of Parkinson's disease**

Márcio Ferreira Dutra^{ab}, Simone Marcuzzo^{ab}, Mariane Jaeger^b, Jocemar Ilha^{ab},
Pedro Ivo Kalil-Gaspar^b, Matilde Achaval^{ab}

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

^bLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
RS, Brazil

Footnotes to the title: Exercise induces GFAP expression in 6-OHDA model of PD

Communicating author: Matilde Achaval

Laboratório de Histofisiologia Comparada

Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sarmiento Leite 500, CEP:90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: achaval@ufrgs.br

Tel: +55-51-33083624

Fax:+55-51-33083092/33083146

Abstract

The aim of this study was to investigate whether exercise could improve motor behavioral deficits and alter expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in dorsal striatum in a 6-hydroxydopamine (6-OHDA) rat model of Parkinson's disease (PD). To this end, animals were randomly divided into 4 groups: sham sedentary (SS, n = 7); sham trained (ST, n=8); lesioned sedentary (LS, n=8) and lesioned trained (LT, n = 8). Rats were unilaterally lesioned with 6-OHDA (10 µg/3 µg) injected into the left medial forebrain bundle and sham groups were only injected with vehicle solution. The treadmill training protocol consisted of running with progressive increase in velocity, 5 days/week, during 4 weeks. Behavioral tasks were applied to assess the motor abilities of all animals prior to 6-OHDA injection and at 8th and 29th days post-injection. The tyrosine hydroxylase (TH - in substantia nigra pars compacta) and GFAP (in dorsal striatum) immunostaining was evaluated by semiquantitative analysis of the intensity (optical density - OD). The 6-OHDA lesion decreased the OD of TH and increased the OD of GFAP. In addition, the 6-OHDA lesion increased the number of ipsilateral rotations induced by methylphenidate (40 mg/kg, i.p., 30 min) and caused motor behavioral deficits. On the other hand, the treadmill training resulted in an increase in maximal exercise capacity in both trained groups (ST and LT). The training was able to reduce the number of ipsilateral rotations and ameliorated the motor behavioral deficits on 8th and 29th days post-lesion. Interestingly, the exercise led to a significant increase in OD of GFAP in the LT group while there was no such effect in ST group. Our results indicate that treadmill training can improve motor behavioral deficits and suggest that the effects of exercise may be directly or, indirectly, mediated by astrocytes, as an increase in

GFAP was observed in the dorsal striatum. Nevertheless, these are the first data showing an increase in GFAP expression post-exercise in this model and further research is needed to determine the precise action of exercise on astrocytes in Parkinson's disease.

Keywords: Exercise; Treadmill training; Parkinson's disease; 6-OHDA; Astrocytes; GFAP

Exercise improves motor behavioral deficits and induces GFAP expression in a 6-OHDA model of Parkinson's disease

Introduction

Idiopathic Parkinson's disease (PD), the second most common neurodegenerative disease, usually manifests itself in the fifth or sixth decade of life and affects 1% of the population above the age of 65 (Zigmond and Burke, 2002; Lang and Lozano, 1998). PD is characterized by disabling motor abnormalities, such as rest tremor, muscle stiffness, paucity of voluntary movements, and postural instability (Fahn and Przedborski, 2000). Its primary neuropathological feature is the specific loss of the nigrostriatal dopaminergic neurons, whose cell bodies reside in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and whose nerve terminals project to the striatum (Fahn and Przedborski, 2000).

Although genetic mutations have been linked to the development of PD, additional factors have been recognized that may add to the propagation of the neurodegenerative process. One such factor is glial reaction, which is found in PD patients as well as in experimental models of PD, and the presence of which suggests its involvement in the pathogenesis of the disease (Forno et al., 1992; Sheng et al., 1993). Astrocytic activation is characterized by an increased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), enlarged cell body and projections in the injured area (Eddleston and Mucke, 1993). In many, but not all, cases of PD a mild increase in the number of astrocytes and in GFAP immunoreactivity has been observed (Forno et al., 1992). The amount of glutathione peroxidase-positive astrocytes in PD patients correlates inversely to the amount of dopaminergic cell

death (Damier et al., 1993), suggesting that dopaminergic neurons in an area with fewer astrocytes are more susceptible to the degenerative process.

In addition, findings indicate a neuroprotective role for activated astrocytes in PD and in experimental models of PD. It has also been shown that astrocytes may protect dopaminergic neurons by scavenging toxic compounds released by dying neurons (Teismann, 2004) and reduce the oxidative stress by metabolizing dopamine (DA), as they express monoamine oxidase-B (MAOB) and catechol-O-methyltransferase (COMT) (Hirsch et al., 1999). Taken together these findings support the view that astrocytes may have a neuroprotective role in PD.

Animal models are important tools in the study of pathogenic mechanisms and therapeutic strategies in human diseases. Through the use of an animal model, the striatal dopamine deficiency was associated with symptoms of PD (Betarbet, Sherer and Greenamyre, 2002). 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a hydroxylated analogue of dopamine, is the first agent found to have specific neurotoxic properties to catecholaminergic neurons via oxidative stress and mitochondrial dysfunction (Jellinger, 2003). The 6-OHDA model has been produced in many species, most frequently in rats, to study mechanisms underlying PD (Offen et al., 1998) and experimental therapeutic strategies (Thompson, 1992; Winkler et al., 1996).

6-OHDA has been predominantly used to produce unilateral lesions (Beal, 2001) that cause an asymmetric and quantifiable motor behavior (circling or rotational behavior). The rotational behavior occurs when striatal dopamine loss exceeds 70% (Jellinger, 2003) and it correlates with the degree of cell loss in the SNpc (Lee et al., 1996; Przedborski et al., 1995). Therefore, measurements of rotation have usually been used for determining the degree of damage (Perese et al., 1989). Other behavioral deficits, such as paw reach, asymmetry use of forelimbs,

akinesia, bradykinesia, stepping and sensory neglect tasks, also occur (Allbutt and Henderson, 2007; Cohen et al., 2003; Tillerson et al., 2003; Beal, 2001). Another common way to evaluate the degree of dopaminergic neurodegeneration is by immunocytochemically staining for tyrosine hydroxylase (TH), because TH is the limiting enzyme for DA synthesis and is clearly decreased after dopaminergic toxic insults (Emborg, 2004).

Exercise is thought to improve motor function and emotional well-being in patients with PD. Clinical studies of PD patients have reported exercise-induced increases in motor scores, cognitive function, mood, and performance of everyday activities (Baatile et al., 2000; Miyai et al., 2000; Nieuwboer et al., 2001), and these improvements can last for many weeks after the cessation of the exercise regimen (Sunvisson et al., 1997; Reuter et al., 1999). In many animal models of PD, different kinds of exercise have been shown to produce beneficial effects on motor behavioral as well as on neurochemical deficits, like immunohistochemistry for TH, dopamine transporter (DAT), vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) and striatal DA levels (its metabolites) (Cohen et al., 2003; Tillerson et al., 2003, 2001). These results demonstrate that exercise following nigrostriatal damage ameliorates related motor symptoms and neurochemical alterations in rodent models of PD.

However, it is not clear if the improvements are due to a more general effect of exercise on affect and motivation or result from neurochemical alterations within the affected nigrostriatal region. More specifically, there is no data on the effects of exercise on astrocytes in this animal model of PD. Thus, the purpose of this study was to investigate whether treadmill training could improve motor behavioral deficits (maximal exercise capacity, methylphenidate-induced rotation, akinesia and bradykinesia) and neurochemical changes (GFAP immunohistochemistry) in a 6-

OHDA rat model of PD.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats from a local breeding colony (ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil) were housed in standard plexiglass boxes, under 12:12 h light/dark cycle, in a temperature-controlled environment (20 ± 1 °C), with food and water available *ad libitum*. All the procedures were approved by the Ethics Committee at the Federal University of Rio Grande do Sul and were in accordance with Brazilian law and recommendations of the Brazilian Society for Neurosciences, Review Committee of the School of Veterinary Surgery, University of Buenos Aires and the International Brain Research Organization (IBRO), and are in compliance with the National Institute of Health's *Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals* (publication n^o. 85-23, revised 1985). During the experiment, all efforts were made to reduce the number of animals used and to minimize any distress or discomfort.

The animals were randomly divided in 4 groups: (1) sedentary sham (SS, n = 7); (2) trained sham (ST, n=8); (3) lesioned sedentary (LS, n=8) and lesioned trained (LT, n = 8).

Stereotaxic Surgery

Male rats weighing 300-350 g at the time of surgery (Day 0) were anesthetized with equithesin (25 mg/kg de pentobarbital (Roche, Brazil) and 150 mg/kg chloral hydrate (Sigma, USA, i.p.) followed by atropine sulfate (0.1 mg/kg i.p.) (Sigma, USA)

to facilitate respiration prior to being placed in the stereotaxic apparatus (Insight, Brazil). 6-OHDA hydrobromide (10 µg; Sigma, USA) was dissolved in 3 µL of fresh vehicle solution (0.9% sterile saline containing 0.02% ascorbic acid), and infused unilaterally into the medial forebrain bundle at an infusion rate of 0.5 µL/min (3.3 mm posterior and 1.8 mm to bregma, and 8.1 mm ventral to dura-mater according to Paxinos and Watson's Atlas, 1998) using a syringe micro-pump (Insight, Brazil) connected to a 10 µL Hamilton syringe fitted with a 32G dental needle. The needle was left in place at each site for 2 min to allow diffusion of the neurotoxin. Control-operated rats (sham) received just the vehicle solution (3 µL) using the same stereotaxic surgical procedures. After surgery, all rats were placed in an incubator to prevent hypothermia.

Maximal Exercise Test

The maximal exercise test (MET) was used to determine the maximal exercise capacity (MEC). Three days prior to surgery, all animals were adapted on the treadmill during 10 min at 5 m/min. Two days after the surgery they were submitted to the MET. The test consisted of a graded exercise on the treadmill, with speed increments of 5 m/min every 3 min, starting at 5 m/min and continuing up to the MEC of each rat (Melo; Martinho and Michelini, 2003). The values attained in the MET, were used to plan the treadmill training program. A new MET was repeated at the end of treadmill training to evaluate the efficacy of the training protocol and also the effects of 6-OHDA on the MEC.

Treadmill training

The training program was performed on a treadmill designed for human use

(Runner, Brazil) and modified for use by rats. This training program began two days after the surgery and consisted of running on the treadmill for 20 min on the first day, this period being progressively increased every day up to 50 min on the fifth day and 60 min in the next 3 weeks. Each training session included a warm-up period of 5 min running at 30% of the MEC (maximal velocity) reached in the MET, 10 to 50 min running at 55% to 60% and 5 min recovery at 30% again. This was repeated in 5 sessions per week, once a day during 4 weeks (adapted from: Van Meeteren et al., 1997).

Drug-induced rotation

Animals were injected with methylphenidate (40 mg/kg, i.p; Ritalina®, Novartis, Brazil). Immediately, they were placed in a cylindrical cage (240 mm in diameter, 300 mm in height) and videotaped for 30 min. The number of rotations ipsilateral to the lesioned side was determined (adapted from Silvestrin et al., 2008).

Narrow beam test

The narrow beam used for the present experiment was a 105 cm long wooden beam, 4 cm wide and 3 cm thick. The beam was suspended 80 cm from the ground by wooden supports at either end. The wooden supports at the “starting” end of the beam formed a sheer drop while a platform was located at the other end, next to which was placed the home cage of the rat being tested.

Foam padding (1 m wide, approximately 12 cm thick) was placed beneath the beam to prevent injury to the animals in case of a fall. A line was drawn 20 cm from the start end of the beam. During a test the rat was entirely placed within this 20 cm starting zone facing its home cage and a stopwatch immediately started upon release

of the animal.

The time was recorded when the animal placed a weight bearing step entirely over the start line. This time represented the latency to begin the task (as an index of akinesia in parkinsonian animals) and also the time taken to cross the beam (total time: measuring bradykinesia in parkinsonian animals). The stopwatch was then stopped when all four feet were placed entirely upon the finishing platform at the opposite end of the beam. A testing session consisted of three trials on the beam, recording three latencies to begin the test, and three total times on the beam for each animal (Adapted from: Allbutt and Henderson, 2007). During the experiment, one day before each test day, each animal was given three opportunities to learn to cross the beam.

Immunohistochemistry

After the end of the experimental period, the rats were deeply anesthetized with thiopental (200 mg/kg, i.p.; Cristalia, Brazil), injected with 1000 IU heparin (Cristalia, Brazil) and transcardially perfused using a peristaltic pump (Milan, Brazil) at a flow rate of 40 mL/min, with 150 mL of saline solution, followed by 150 mL of 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) at room temperature. After perfusion the brains were removed from the skulls, post-fixed in the same solution at room temperature for 4 h and cryoprotected by immersion in 30% sucrose solution in PB at 4°C until they sank. After, the brains were frozen by brief immersion in isopenten (Reagen, Brazil) followed by brief immersion in nitrogen (Reagen, Brazil) and saved in a freezer (-70°C) for later analyses.

Serial coronal sections (40 µm) were obtained using a cryostat (Leica, Germany) at -20°C and collected in 0.1M PB, 0.9% Na Cl, pH 7.4 (phosphate-

buffered saline - PBS). For immunohistochemistry, the free-floating sections were pretreated in 3% hydrogen peroxidase (H_2O_2) for 30 min, carefully washed and blocked with 2% bovine serum albumin (BSA - Sigma, Brazil) in PBS containing 0.3% Triton X-100 (PBS-Tx, Sigma) for 30 min and incubated with the chosen antibodies (TH or GFAP).

For TH immunohistochemistry, tissue sections of SNpc (-4.8 to -5.80mm from bregma, according to Paxinos and Watson's Atlas, 1998) were incubated in a monoclonal TH antibody conjugated with Peroxidase Anti-Peroxidase (PAP) Complex produced in mouse (Sigma, USA), diluted 1:750 in PBS-Tx for 48 h at 4°C. After washing several times, sections were incubated in an Anti-Mouse IgG antibody produced in rabbit (Sigma, USA). diluted 1:300 in PBS-Tx at room temperature for 2h.

In addition, for GFAP immunohistochemistry sections of dorsal striatum (1.7 to -0.26 mm from bregma, according to Paxinos and Watson's Atlas, 1998) were incubated in polyclonal anti-GFAP from rabbit (Sigma, USA) and diluted 1:150 in PBS-Tx for 48 h at 4 °C. After washing several time s, tissue sections were incubated in a rabbit PAP-conjugated anti-rabbit IgG (Sigma, USA), diluted 1:150 in PBS at room temperature for 2h. The reaction was revealed by incubating the sections in a histochemical medium that contained 0.06% 3,3-diaminobenzidine dissolved in PBS for 10 min and then, in the same solution containing 1 μ M of 3% H_2O_2 per mm of DAB medium for approximately 10 min. Afterwards, the sections were rinsed in PBS, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and covered with Entellan and coverslips. Control sections were prepared by omitting the primary antibody and replacing it with PBS.

The brains of the animals were fixed and post-fixed for the same time in

identical solutions and rigorously processed at the same time, and the sections were incubated in an identical medium for the same period of time. This precaution was taken to avoid overreaction, differences in chromogen reaction, saturation of optical density, and changes in background levels. Note that DAB may be carcinogenic, and for this reason, the development procedure should be performed in a laminar air flow chamber with special care and gloves. Afterwards, all glassware and other equipment exposed to DAB solutions were bleached, for at least 24 h, with a 10% sodium hypochlorite solution and carefully washed in water. In case of contact, immediately flush the skin with water (Xavier et al., 2005).

Image Analysis

From each rat, ten images (TIF format) of the lesioned side (left hemisphere - magnification x200) of each SNpc and dorsal striatum were obtained with an Nikon E600 light microscope coupled to a USB 2.0 Digital Camera Eyepiece (DCE-2, China). Images were processed and analyzed with ImageJ 1.40 software (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Briefly, RGB (24-bits) color images (640x480 pixels) were converted to 8-bit grayscale images (0–255 gray levels). All lighting conditions and magnifications were held constant and the investigator was unaware of the experimental groups. A reference image of an empty field was recorded and ImageJ's Calculator Plus Plugin 'divide' operation was used for correction of unequal illumination (shading correction). The algorithm employed in the shading correction was based on the following formula:

$$C_{lx,y} = [(I_{lx,y} - BL) / (B_{lx,y} - BL) \times (M - BL)] + BL$$

where $C_{lx,y}$ = new pixel in the corrected image; $I_{lx,y}$ = pixel value of the original image at location (x, y); $B_{lx,y}$ = pixel value of the background image at location (x, y);

M = average pixel value of the background image; BL = black is the intensity generated when no lights goes through the material, in our case 0 (0–255) was used.

Rectangular areas of interest (AOI) were set for SNpc (480x220 pixels) and dorsal striatum (450x20 pixels) images. The optical density of each AOI was measured in the form of uncalibrated optical density [$10/\log(255/255\text{-pixel value})$]. Background staining was subtracted from optical density measurements using averaged values of tissue sections where primary antibody was omitted (Xavier et al., 2005).

Statistical Analysis

The data (CME and evaluated parameters in the narrow beam test) were analyzed using two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA; $n = 7\text{-}8$ rats per group) with 6-OHDA lesion and treadmill training as independent variables and time as the repeated measure.

The other data (optical density of TH and GFAP and methylphenidate-induced rotation) were analyzed using two-way ANOVA.

All analyses were followed by Fisher's Least Significant Difference (LSD) post-hoc test. Data were expressed as means \pm S.E.M. Probability values less than 5% were considered significant. Statistical analysis was performed using the Statistica software package.

Results

Performance in the maximal exercise test and efficacy of the treadmill training

protocol

No difference was found between the groups in the performance of the MET before the treadmill training (Fig. 1). Nevertheless, the treadmill training significantly increased the maximal exercise capacity (MEC) in both trained groups after the period of training (ST: 28 ± 1.42 m/min; LT: 23 ± 1.42 m/min) when compared to values before the training (ST: 19 ± 1.27 m/min, $P = 0.001$; LT: 16 ± 1.27 m/min, $P = 0.001$). In the LS group, the 6-OHDA lesion had no effect on MEC when the values before (16 ± 1.27 m/min) and after the experimental period (18 ± 1.42 m/min, $P = 0.5$) were compared. On the other hand, the training was seen to produce similar effects in both trained groups (ST and LT) when compared to the post-training values of the SS (23 ± 1.42 m/min, $P = 0.001$) and LS (18 ± 1.42 m/min, $P = 0.02$) groups. Nevertheless, the effects of treadmill training was more robust in the ST (28 ± 1.42 m/min) group when compared to LT group (23 ± 1.42 m/min, $P = 0.02$).

Methylphenidate-induced rotation

Animals submitted to 6-OHDA lesion, sedentary (LS: 221 ± 19) and trained (LT: 145 ± 19), showed a significant increase in the number of ipsilateral rotations when compared to both sham groups (SS: 41 ± 20 ; ST: 46 ± 19 , $P = 0.001$) (Fig. 2). The 4-week treadmill training protocol significantly decreased the number of rotations in the lesioned trained group (LT: 145 ± 19) when compared to lesioned sedentary group (LS: 221 ± 19 , $P = 0.008$).

Optical densitometry of TH and GFAP

TH-immunoreactive (TH-ir) neurons were found in SNpc in all groups, sham and 6-OHDA lesioned animals. TH-ir was observed in neuronal cell bodies and their processes. Under light microscopy, the TH-ir sections showed a good resolution,

allowing a precise delineation of the anatomical boundaries of the SNpc.

The 6-OHDA lesion caused a significant decrease in the optical density of TH-ir neurons on the lesioned side of the SNpc in both lesioned groups (LS: 0.26 ± 0.02 ; LT: 0.25 ± 0.08) when compared to sham groups (SS: 0.49 ± 0.03 ; ST: 0.45 ± 0.02 , $P = 0.001$) (Fig. 3). Whereas, the treadmill training was seen to have no effect on OD of TH-ir in ST group (0.45 ± 0.02) when compared to SS group (0.49 ± 0.03 , $P = 0.3$). Also, there was no difference in the LT group (0.5 ± 0.08) when compared to the LS group (0.26 ± 0.02 , $P = 0.8$).

The GFAP-immunoreactive (GFAP-ir) astrocytes were found in the dorsal striatum in all the experimental groups (Fig.4). GFAP-ir was seen in astrocytic cell bodies and their processes. In both lesioned groups, reactive astrocytes were characterized by increases in the size of the cell body and/or processes. This same GFAP-ir was also found in the sham groups, though only bordering the needle track.

The ANOVA for repeated measures applied to the data obtained from GFAP-ir showed a significant increase in the LS group (0.32 ± 0.02) when compared to sham groups (SS: 0.26 ± 0.02 , $P = 0.01$; ST: 0.26 ± 0.02 , $P = 0.008$) (Fig. 5). Also the LT group (0.37 ± 0.02) displayed a significant increase when compared to the SS (0.26 ± 0.02 , $P = 0.001$) and ST (0.26 ± 0.02 , $P = 0.001$) groups. Nevertheless, there was no difference between the LS (0.32 ± 0.02) and LT (0.37 ± 0.02 , $P = 0.5$) groups.

Narrow beam test

No difference was seen between the groups in the latency (the time from release until the first weight bearing step across the starting line) during the three trials before the lesion (pre-lesion), and there was no significant difference between the two sham groups on all days (Fig. 6). Whereas, on 8th post-lesion day, the

latency in the LS (4.73 ± 0.64 sec) and LT (4.63 ± 0.64 sec) groups were significantly increased from pre-lesion values (1.97 ± 0.34 ; 2.17 ± 0.34 sec respectively, $P= 0.001$) and there was no difference between them ($P= 0.9$). In addition, on 29th post-lesion day, the values of both lesioned groups (LS: 6.44 ± 0.5 ; LT: 3.94 ± 0.7 sec) were significantly increased from the pre-lesion values (LS: 1.97 ± 0.34 , $P= 0.001$; LT: 2.17 ± 0.34 sec, $P= 0.003$). The increase in the value of the LS group (LS: 6.44 ± 0.5 sec) on 29th day was significantly greater than the LT group (3.94 ± 0.7 sec, $P= 0.001$). Interestingly, the LT (3.94 ± 0.7 sec) group was not different from the SS (2.83 ± 0.35 sec, $P= 0.15$), and ST (3.19 ± 0.4 sec, $P= 0.3$) groups on 29th post-lesion day .

As with the latency values, there was no difference between the groups in the total time to cross the beam during the three trials before the lesion (pre-lesion) and there was also no significant difference between the two sham groups on all days (Fig. 7). Nevertheless, on the 8th post-lesion day, a significant difference was found between the LS (11.79 ± 0.93 sec) and LT (7.42 ± 0.87 sec) groups ($P= 0.001$) as well as from pre-lesion values (4.77 ± 0.61 sec, $P= 0.001$; 4.88 ± 0.61 , sec $P= 0.008$, respectively). In addition, there was no difference either in the LS group between 8th (11.79 ± 0.93 sec) and 29th post-lesion days (10.52 ± 0.54 sec, $P=0.2$) or in the LT group on the 8th (7.42 ± 0.87 sec) and 29th post-lesion days (7.88 ± 0.54 sec, $P=0.6$). On 29th day the LT group (7.88 ± 0.54 sec) showed a significant reduction in total time when compared to LS group (10.52 ± 0.54 sec, $P=0.02$).

Discussion

Effects of 6-OHDA lesion

To model PD, the animal model must mimic both the dopaminergic cell loss

and the behavioral deficits associated with idiopathic PD (Deumens, 2001). Our results indicate that 6-OHDA infusion was able to lesion the nigrostriatal system measured by OD of TH, methylphenidate-induced rotation and also by behavioral motor deficits (narrow beam test).

The number of ipsilateral methylphenidate-induced rotations was significantly increased in both lesioned groups when compared to the sham groups. When animals are unilaterally lesioned by 6-OHDA, they present rotational activity after administration of a dopamine-acting drug, such as amphetamine, apomorphine, and methylphenidate (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970; Chopin et al., 1999). This drug-induced rotational behavioral is usually considered an index of dopamine depletion (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970). Our results suggest that the lesioned animals lost at least a half their TH-ir neurons, because methylphenidate challenging at 40 mg/kg promotes rotational activity in animals with at least a 50% loss of TH-ir neurons (Hefti et al., 1980; Kuczenski and Segal, 1997).

The 6-OHDA lesion caused a significant decrease in OD of TH-ir in the SNpc. The results found in this study have been previously described (Ferraz et al., 2003; Xavier et al., 2005), and the present investigation confirms the neurotoxicity of 6-OHDA in SNpc neurons.

The changes in the intensity of immunoreaction can be analyzed qualitatively by human judgment or semiquantitatively by optical densitometry (Xavier et al., 2005; Contu and Nelson, 1994; Howard and Reed, 1998; Rasia-Filho et al., 2002). In fact, semi-quantitative densitometric analysis is much more accurate and discriminative than human judgment; the subjectivity of the qualitative evaluations is eliminated in the semi-automated quantification (Xavier et al., 2005).

On the other hand, our data indicate a significant increase in OD of GFAP-ir in

lesioned groups. Nevertheless, the LT group showed a discreet increase when compared to the LS group, suggesting that treadmill training associated to 6-OHDA lesion can lead to increased expression of the GFAP protein. Other studies have previously described an astroglial activation in the ipsilateral nigrostriatal system following small dose of 6-OHDA injected unilaterally in the striatum (Gomide, Bibancos and Chadi, 2005). The same authors reported an astrocytic reaction in the ipsilateral nigrostriatal pathway after 3 weeks of 6-OHDA lesion, with a slight activation also remaining in the ipsilateral septum and piriform cortex (Gomide, Silveira and Chadi, 2005).

The lesioned animals appeared more rigid and more cautious when moving across the beam. Many rats would begin to cross but stop and then reinitiate some movement, or remain stationary, analogous to the freezing behavior observed in Parkinson's patients. However, the 6-OHDA lesion does not appear to affect the balance of the animals. These results are in agreement with a previous study of Allbutt and Henderson (2007) where 6-OHDA lesioned animals demonstrated a four-fold increase in both the latency to initiate the task and the total time to cross the beam when compared to the sham group. The authors also indicated that the narrow beam test may therefore offer a useful way by which these symptoms of PD may be quantified in animal models.

Taken together, these results suggest that dopamine depletion in the dorsal striatum, as consequence of lesion in the nigrostriatal system (measured by OD of TH-ir and by methylphenidate-induced rotation), resulted in both an increased delay in the latency and a reduced speed in crossing the beam (total time), which would be consistent with akinesia and bradykinesia previously observed in both animal models of PD (Allbutt and Henderson, 2007; Gerlach and Riederer, 1996; Lindner et al.,

1999; Salamone et al., 1993) and in PD patients (Albin et al., 1989; Gerlach and Riederer, 1996).

Effects of treadmill training

Before and after 4 weeks of treadmill training all animals were submitted to MET to determine the effects both of training and the 6-OHDA lesion on the performance of the rats. The MET performed 2 days after the surgery (pre-training) showed no differences between all the groups. Nevertheless, both lesioned groups showed a discreet reduction in maximal exercise capacity (MEC) 2 days after the surgery when compared to sham groups, suggesting that 6-OHDA lesion is able to affect performance within a few days after lesion.

Our results showed that the treadmill training protocol used in this study was able to improve the MEC in the ST and LT groups when compared to the sedentary groups (SS and LS respectively), indicating that training can effectively increase the MEC. Interestingly, the treadmill training caused a robust increase in ST group when compared to the SS group and a moderate increase, though significantly different, when compared to the LS group. It seems that the 6-OHDA lesion did not allow a greater increase in MEC, since the ST group showed a higher increase in MEC than the LS group.

On the other hand, the treadmill training protocol was able to ameliorate motor behavioral deficits (significantly reduce the latency and total time) in animals lesioned by 6-OHDA, whereas treadmill training had no such effect on the sham animals. These results are in agreement with previous reports (Tillerson et al., 2001; Tillerson et al., 2003; O'Dell et al., 2007), indicating that exercise is able to improve motor behavioral deficits in a 6-OHDA model of PD.

In the LT group we found a tendency towards increased OD of GFAP-ir when compared to the LS group. Astrocytic activation is characterized by an increased expression of GFAP (Eddleston and Mucke, 1993) and findings suggest a neuroprotective role for activated astrocytes in PD as well as in experimental models of PD (Teismann and Schulz, 2004).

Many pathways by which astrocytes might protect dopaminergic neurons have been reported: astrocytes improve the survival and phenotypic expression of mesencephalic neurons in culture while decreasing the apoptotic demise of these neurons (Sortwell et al. 2000); they scavenge toxic compounds released by dying neurons and may reduce oxidative stress by metabolizing dopamine, as they express COMT (Hirsch et al., 1999); astrocytes are capable of preventing nitric oxide generated neurotoxicity by a glutathione dependent mechanism (Chen et al. 2004).

In addition, another pathway by which astrocytes might protect dopaminergic neurons is the release of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). GDNF has been shown to be a potent survival factor for DA neurons (Lin et al. 1993). Although levels of GDNF protein markedly decrease after development, there is evidence that GDNF can increase with experience, such as an enriched environment (Young et al., 1999).

Cohen and cols (2003), showed if a cast is placed on the ipsilateral limb during the first 7 days following 6-OHDA infusion, forcing the animal to use its contralateral limb, both the behavioral and neurochemical deficits are reduced. Furthermore, animals receiving a unilateral cast alone had an increase in GDNF protein in the striatum corresponding to the overused limb, suggesting that preinjury forced limb-use can prevent the behavioral and neurochemical deficits resulting from the subsequent administration of 6-OHDA and that this may be due in part to

neuroprotective effects of GDNF.

To be effective, GDNF would need to act on its own receptor complex, therefore initiating a signaling cascade that produces cytoplasmic and/or translational changes in DA neurons. Moreover, extracellular signal regulated kinase (ERK), a downstream effector of GDNF, has been shown to be activated after exercise, and to remain elevated for up to 1 month (Shen et al. 2001).

In addition to GDNF, exercise, primarily running, has been shown to increase other neurotrophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF) (Neeper et al. 1996), fibroblast growth factor-2 (FGF-2) (Gomez-Pinilla et al. 1995), and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) (Carro et al. 2001) in certain regions of the CNS, particularly the hippocampus. Although there are few previous reports on the effects of exercise on trophic factors in the striatum, some of these factors have a potent trophic action on DA neurons (Hyman et al. 1991; Altar et al. 1992; Lin et al. 1993; Winkler et al. 1996). Therefore, it seems likely that more than one factor will ultimately be found to be responsible for exercise-induced protection. In this regard, FGF-2, one of the trophic factors shown to be up-regulated by exercise (Gomez-Pinilla et al. 1995), has also been shown in vitro to induce expression of both GDNF and BDNF (Suter-Crazzolara and Unsicker 1996; Kwon 1997).

In summary, our data suggest that exercise (treadmill training) improves motor behavioral deficits in a 6-OHDA model of PD. These findings provide further evidence that physical therapy may be beneficial to patients with PD. In addition, our results showed that exercise combined with 6-OHDA can increase the expression of GFAP in dorsal striatum, indicating that astrocytes may play a role in producing the beneficial effects of exercise in PD. Nevertheless, these are the first data that show

an increase in post-exercise expression of GFAP in this model and further investigation is needed to determine the precise action of exercise on astrocytes in this model of Parkinson's disease.

References

Allbutt, H.N., Henderson, J.M., 2007. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J. Neurosci. Meth.*, 159: 195-202.

Baatile, J., Langbein, W.E., Weaver, F., Maloney, C., Jost, M.B., 2000. Effect of exercise on perceived quality of life of individuals with Parkinson's disease. *J. Rehabil. Res. Dev.*, 37(5): 529-534.

Beal, M.F., 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2: 325-334.

Chopin, P., Colpaert, F.C., Marien, M., 1999. Effects of alpha-2 adrenoceptor agonists and antagonists on circling behavior in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288: 798–804.

Cohen, A.D., Tillerson, J.L., Smith, A.D., Schallert, T., Zigmond, M.J., 2003. Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *J. Neurochem.*, 85: 299-305.

Contu, G.R., Nelson, J.W., 1994. Densitometry: modern approaches advance an

established technique. *Biotechniques.*, 16: 322-327.

Damier, P., Hirsch, E.C., Zhang, P., Agid, Y., Javoy-Agid, F., 1993. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience.*, 52: 1-6.

Betarbet, R., Sherer, T.B., Greenamyre, T., 2002. Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays*, 24: 308-318.

Eddleston, M., Mucke, L., 1993. Molecular profile of reactive astrocytes -implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience.*, 54: 15-36.

Emborg, M. E., 2004. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J. Neurosci. Meth.*, 139: 121-143.

Fahn, S., Przedborski, S., 2000. Parkinsonism. In: Rowland LP (ed) *Merritt's neurology*. Lippincott Williams & Wilkins, New York, pp 679–693.

Ferraz, A.C., Xavier, L.L., Hernandez, S., Sulzbach, M., Viola, G.G., Anselmo-Franci, J.A., Achaval, M., Da Cunha, C., 2003. Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6 hydroxydopamine. *Brain Res.*, 986: 200-205.

Forno, L.S., DeLanney, L.E., Irwin, I., Di Monte, D., Langston, J.W., 1992. Astrocytes and Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.*, 94: 429-436.

Howard, C.V., Reed, M.G., 1998. *Unbiased Stereology*, Springer, New York, p. 246.

Jellinger, K., 2003. Chapter 4. Synucleinopathies: experimental models of synucleinopathies. In: Dickson, D.W. (Ed.), Neurodegeneration. ISN Neuropath, Press, Basel, pp. 215-223.

Kandel, E.R., 2000. Nerve cells and behavior. In: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., (eds). Principles of neural science. McGraw-Hill, New York, pp 19-35.

Kuczenski, R., Segal, D.S., 1997. Effects of methylphenidate on extracellular dopamine, serotonin, and norepinephrine: comparison with amphetamine. J. Neurochem., 68: 2032-7.

Lang, A.E., Lozano, A.M., 1998. Parkinson's disease. First of two parts. N. Engl. J. Med., 339: 1044-1053.

Lee, C.S., Sauer, H., Bjfrklund, A., 1996. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. Neuroscience., 72: 641-653.

Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., Collins, F., 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science., 21: 1130-1132.

Melo, R.M., Martinho, E., Michelini, L.C., 2003. Training-induced, pressurelowering effect in SHR. Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised

muscles. *Hypertension.*, 42: 851-857.

Miyai, I., Fujimoto, Y., Ueda, Y., Yamamoto, H., Nozaki, S., Saito, T., Kang, J., 2000. Treadmill training with body weight support: its effect on Parkinson's disease. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 81(7): 849-852.

Nieuwboer, A., De Weerdt, W., Dom, R., Truyen, M., Janssens, L., Kamsma, Y., 2001. The effect of a home physiotherapy program for persons with Parkinson's disease. *J. Rehabil. Med.*, 33(6): 266-272.

O'Dell, S.J., Gross, N.B., Fricks, A.N., Casiano, B.D., Nguyen, T.B., Marshall, J.F., 2007. Running wheel exercise enhances recovery from nigrostriatal dopamine injury without inducing neuroprotection. *Neuroscience.*, 144: 1141-1151.

Offen, D., Beart, P.M., Cheung, N.S., Pascoe, C.J., Hochman, A., Gorodin, S., Melamed, E., Bernard, R., Bernard, O., 1998. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5789-5794.

Paxinos, G., Watson, C., 1998. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press., San Diego.

Rasia-Filho, A.A., Xavier, L.L., Santos, P., Gehlen, G., Achaval, M., 2002. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats, *Brain Res. Bull.*, 58: 67-75.

Reuter, I., Engelhardt, M., Stecker, K., Baas, H., 1999. Therapeutic value of exercise training in Parkinson's disease. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 31(11): 1544-1549.

Schallert, T., Fleming, S.M., Leasure, J.L., Tillerson, J.L., Bland, S.T., 2000. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology.*, 39(5): 777-787.

Shen, H., Tong, L., Balazs, R., Cotman, C.W., 2001. Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. *Neuroscience.*, 107: 219-229.

Sheng, J.G., Shirabe, S., Nishiyama, N., Schwartz, J.P., 1993. Alterations in striatal glial fibrillary acidic protein expression in response to 6-hydroxydopamine-induced denervation. *Exp. Brain. Res.*, 95: 450-456.

Silvestrin, R.B., Oliveira, L.F., Batassini, C., Oliveira, A., Souza, T.M., 2008. The footfault test as a screening tool in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci Methods.*, in press.

Sunvisson, H., Lökk, J., Ericson, K., Winblad, B., Ekman, S.L., 1997. Changes in motor performance in persons with Parkinson's disease after exercise in a mountain area. *J. Neurosci. Nurs.*, 29(4): 255-260.

Ungerstedt, U., Arbuthnott, G.W., 1970. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.*, 24: 485-493.

Tillerson, J.L., Caudle, W.M., Reverón, M.E., Miller, G.W., 2003. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 119: 899–911.

Tillerson, J.L., Cohen, A.D., Philhower, J., Miller, G.W., Zigmond, M.J., Schallert, T., 2001. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. *J. Neurosci.*, 21: 4427-4435.

Tillerson, J.L., Cohen, A.D., Caudle, W.M., Zigmond, M.J., Timothy Schallert, T., Miller, G.W., 2002. Forced Nonuse in Unilateral Parkinsonian Rats Exacerbates Injury. *J. Neurosci.*, 22: 6790-6799.

Tillerson, J.L., Caudle, W.M., Reveron, M.E., Miller, G.W., 2003. Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of parkinson's disease. *Neuroscience.*, 119: 899-911.

Thompson, L., 1992. Fetal transplants show promise. *Science.*, 257: 868-870.

Van Meeteren, N.L.U., Brakkee, J.H., Hamers, F.P.T., Helders, P.J.M., Gispen, W.H., 1997. Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction

velocity after nerve crush lesion in the rat. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 78: 70-77.

Winkler, C., Sauer, H., Lee, C.S., Bjfrklund, A., 1996. Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.*, 16: 7206-7215.

Xavier, L.L., Viola, G.G., Ferraz, A.C., Da Cunha, C., Deonizio, J.M., Netto, C.A., Achaval, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area, *Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 16: 58-64.

Young, D., Lawlor, P.A., Leone, P., Dragunow, M., During, M.J., 1999. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nat. Med.*, 5: 448-453.

Zigmond, M.J., Burke, R.E., 2002. Pathophysiology of Parkinson's disease, In: Davis, K.L., Coyle, J., Charney, D., Nemeroff, C. (Eds.), *Fifth Generation of Progress*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1781–1794.

Fig. 1 - Performance of rats in the maximal exercise test before and after the 6-OHDA lesion and treadmill training. Note that prior to training there was no significant difference between all the groups. The 6-OHDA lesion had no effect on MEC when the values of the LS group were compared before and after the experimental period. The treadmill training significantly increased the maximal exercise capacity (MEC) in both trained groups (ST and LT). All values are expressed as mean \pm S.E.M. a ($P=0.001$) when comparing ST pre and post-training; b ($P=0.001$) when comparing LT pre and post-training; c ($P=0.02$) when comparing the ST group to LT group post-training; d ($P=0.02$) when comparing the LS group to LT group post-training.

Fig. 2 - Effects of 6-OHDA lesion 22 days after the surgery and effects of treadmill training 20 days after the beginning of exercise in methylphenidate-induced rotation. The 6-OHDA lesion significantly increased methylphenidate-induced rotations in both lesioned groups compared to both sham groups. In addition, the treadmill training significantly attenuated methylphenidate-induced rotations in lesion animals compared to those in sedentary animals. All values are expressed as mean \pm S.E.M of ipsilateral rotations in 30 min. a ($P=0.001$) when comparing LS and LT groups to sham groups, b ($P=0.008$) when comparing LT to LS group.

Fig. 3 - Effects of 6-OHDA lesion and treadmill training on semiquantitative analysis of the intensity (optical density) of TH immunostaining in SNpc. Note that sham groups are significantly different from lesioned groups, indicating that 6-OHDA lesion was able to cause loss of DA neurons in SNpc. There was no significant difference between both sham groups and also between both lesioned groups. Mean (\pm S.E.M.), a ($P=0.001$) when comparing LS and LT groups to sham groups.

Fig. 4 - Digitalized images from the dorsal striatum showing the GFAP-ir in astrocytic cell bodies (arrows) and their processes (thin arrows). Note the presence of reactive astrocytes in both lesioned groups, characterized by an increased of GFAP-ir (enlarged cell body and process). SS= sham sedentary; ST= sham trained; LS= lesioned sedentary; lesioned trained. Bar= 40 μ m.

Fig. 5 - Effects of 6-OHDA lesion and treadmill training in semiquantitative analysis of the intensity (optical density) of GFAP immunostaining in dorsal striatum. Note that the lesioned groups showed a significant increase when compared to sham groups. There was no significant difference between both sham groups and also between both lesioned groups. Mean (\pm S.E.M.); a ($P= 0.01$) when comparing LS to SS; b ($P= 0.008$) when comparing LS to ST group; c ($P= 0.001$) when comparing LT to SS and ST groups.

Fig. 6 - Effects of 6-OHDA lesion and treadmill training on the 8th and 29th days after the surgery. The data represents the mean (\pm S.E.M.) of latencies to begin crossing the beam in three trials. There was no significant difference between all the groups on pre-lesion and there was no significant difference between both sham groups on all days. Note that 6-OHDA lesion caused a significant increase in latency and that the treadmill training reduced the latency of LT group on the 29th day. a ($P= 0.001$) when comparing to the latencies of the LS and LT groups between 8th day to pre-lesion; b ($P= 0.04$) when comparing the LS and LT groups between 29th day to pre-lesion; c ($P= 0.001$) when comparing the LS and LT groups on 29th days post-lesion.

Fig. 7 - Effects of 6-OHDA lesion and treadmill training on 8th and 29th days after the surgery. The data represents the mean (\pm S.E.M.) of latencies to begin crossing the

beam in three trials. There was no significant difference between all the groups on pre-lesion and there was no significant difference between both sham groups on all days. Note that 6-OHDA lesion caused a significant increase in total time and that the treadmill training reduced the latency of the LT group on the 8th and 29th days. a ($P=0.001$) when comparing the LS and LT groups between 8th day to pre-lesion; b ($P=0.001$) when comparing the LS and LT groups on 8th day post-lesion; c ($P=0.02$) when comparing LS and LT groups between 29th day post-lesion to pre-lesion; d ($P=0.001$) when comparing the LS and LT groups on 29th day post-lesion.

Figure 1

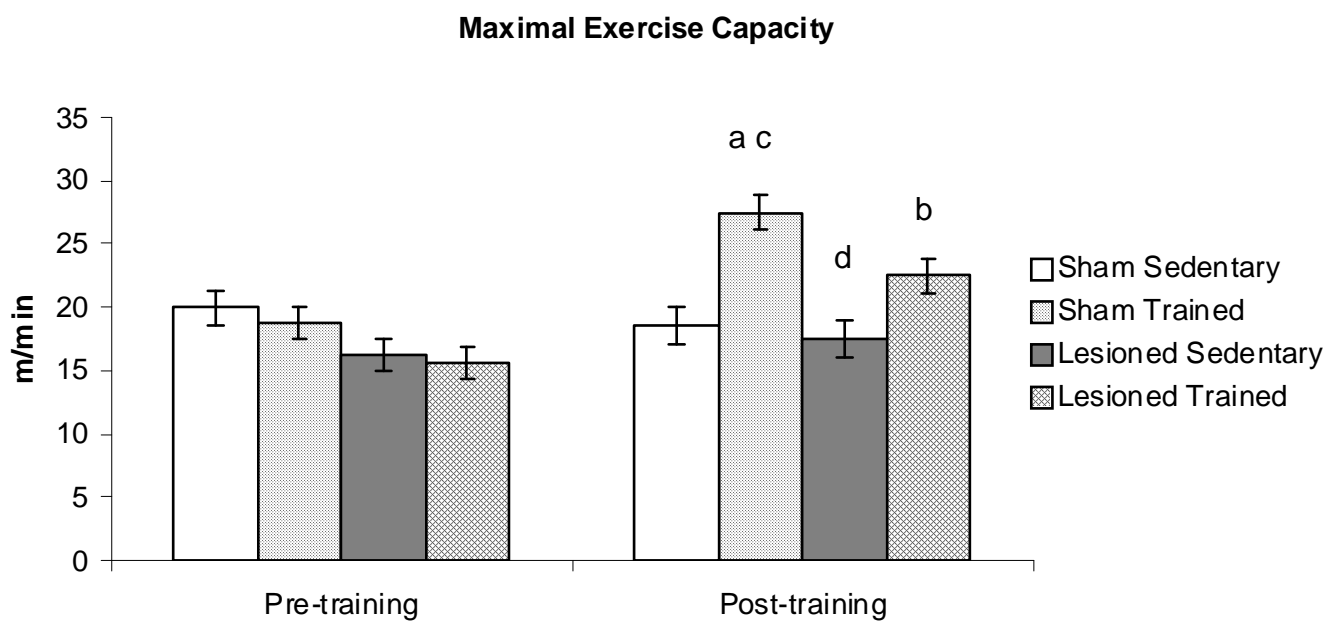


Figure 2

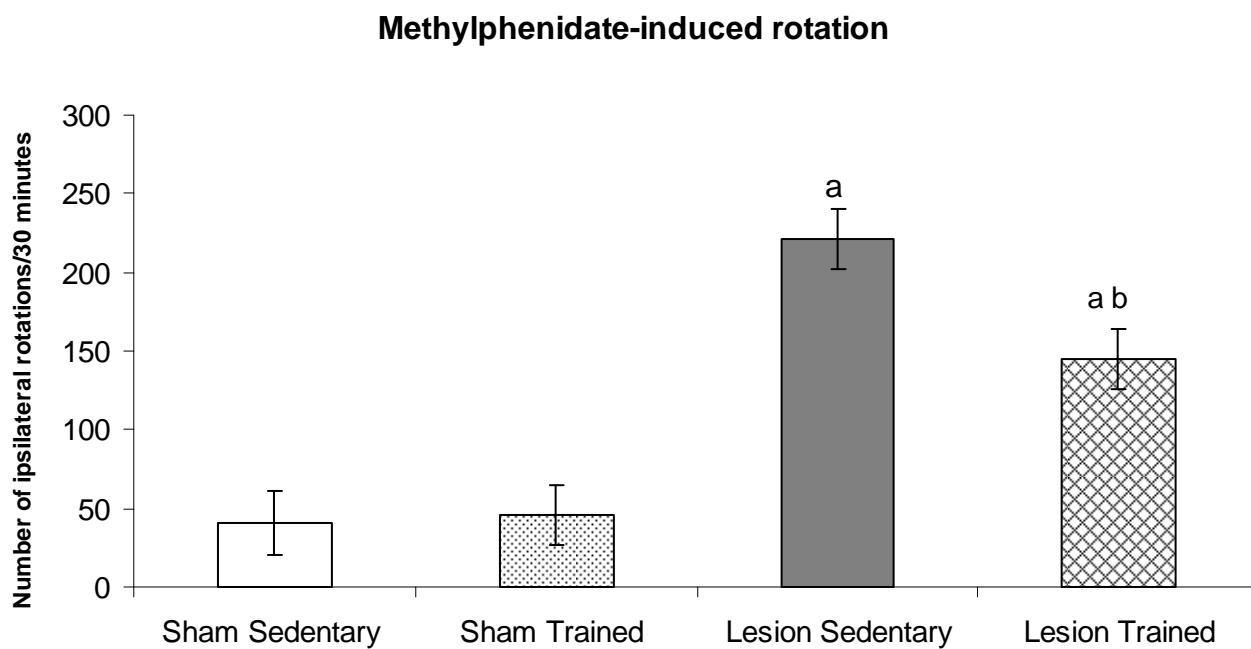


Figure 3

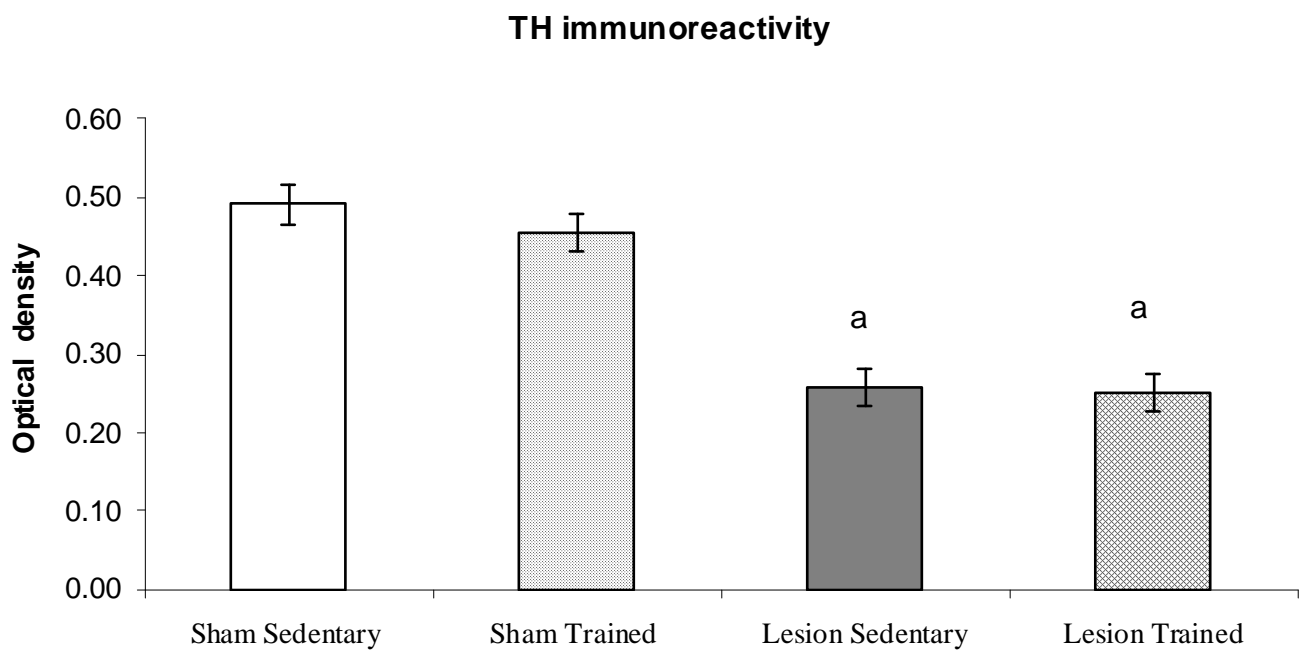


Figure 4

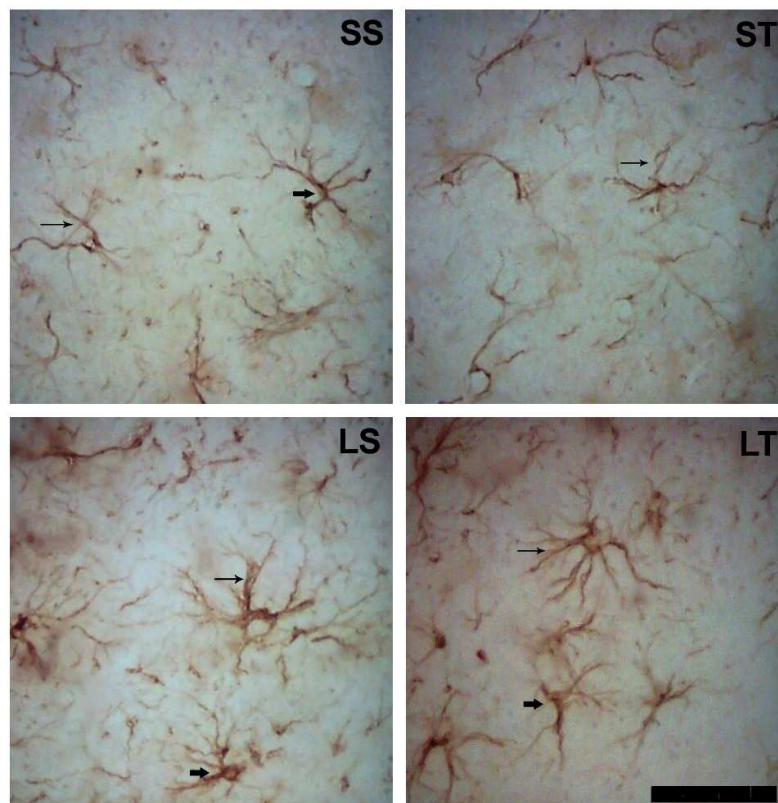


Figure 5

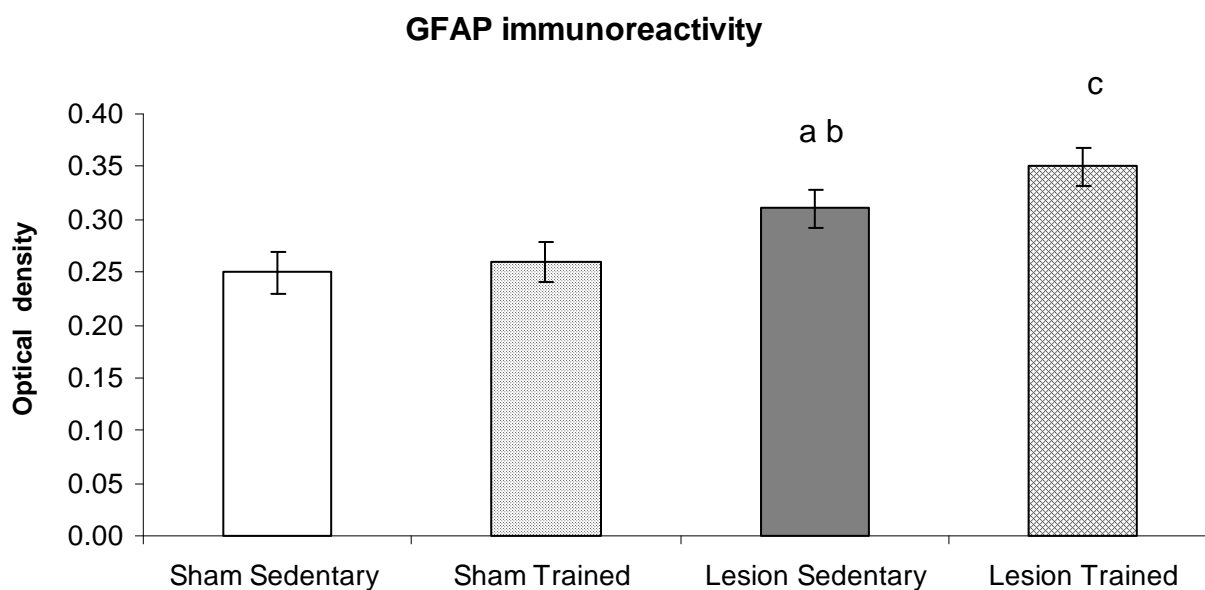


Figure 6

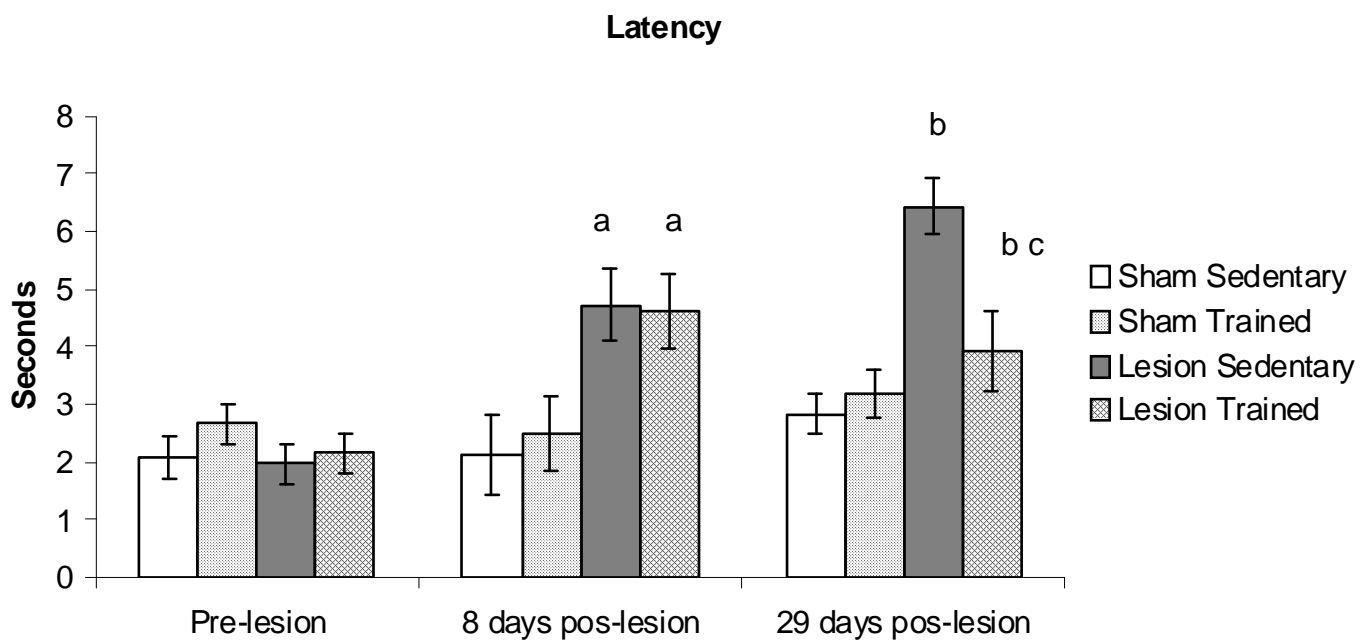
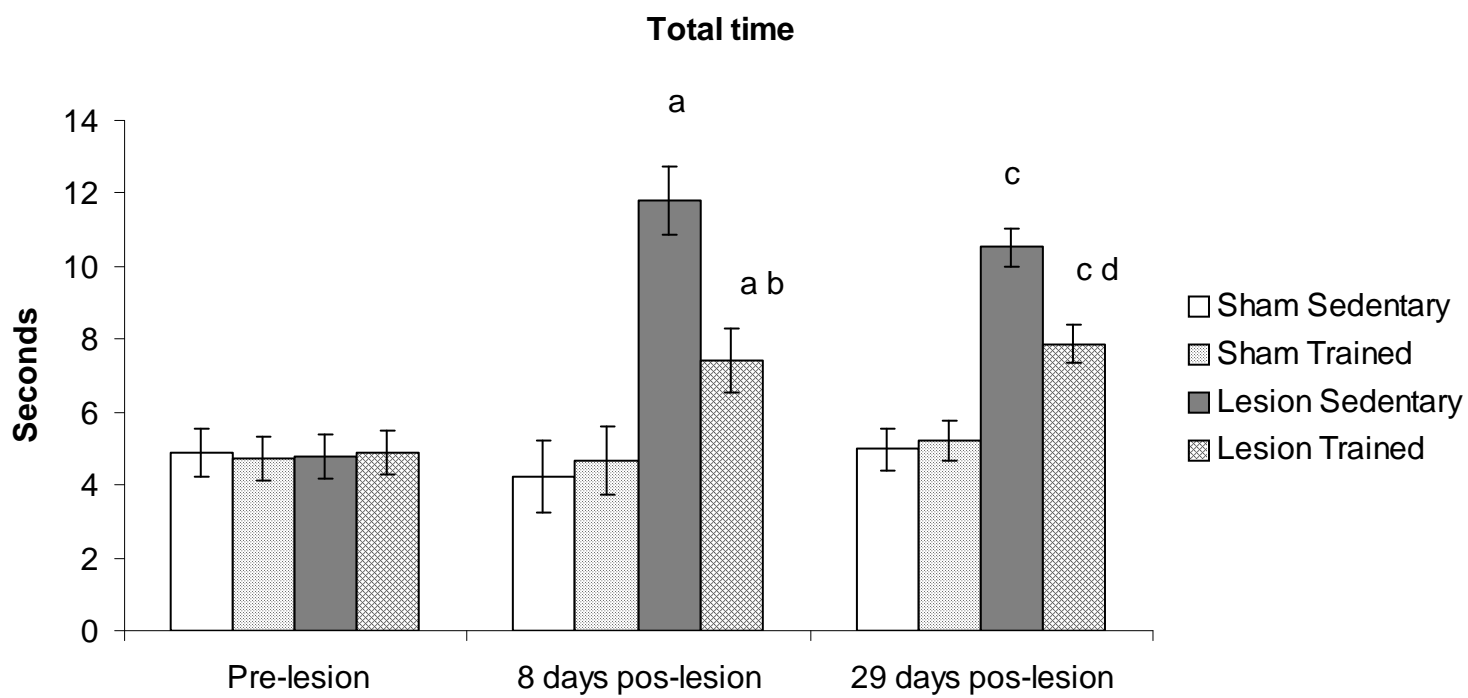


Figure 7



4. DISCUSSÃO

Efeitos da lesão induzida por 6-OHDA

Para reproduzir a doença de Parkinson, o modelo animal precisa mimetizar a perda de células dopaminérgicas e os déficits comportamentais associados com a DP idiopática (DEUMENS, 2001). Nossos resultados indicaram que a infusão de 6-OHDA foi capaz de lesar o sistema nigroestriatal, mensurado através da DO para TH, rotações induzidas por metilfenidato e também pelos déficits do comportamento motor (*narrow beam test*).

O número de rotações ipsilaterais induzidas por metilfenidato foi significativamente maior em ambos os grupos lesionados quando comparados aos grupos *sham*. Quando os animais são unilateralmente lesionados pela 6-OHDA, eles apresentam atividade rotacional após a administração de drogas com ação dopaminérgica, como anfetamina, apomorfina e metilfenidato (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970; CHOPIN et al., 1999). Este comportamento rotacional induzido por drogas é usualmente considerado como um índice de depleção dopaminérgica (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970). Nossos resultados sugerem que os animais lesionados tiveram uma perda de pelo menos metade dos neurônios TH-positivos, tendo em vista que o metilfenidato na dose de 40 mg/kg promove atividade rotacional em animais com uma perda de pelo menos 50% dos neurônios TH-positivos (HEFTI et al., 1980; KUCZENSKI; SEGAL, 1997).

A lesão por 6-OHDA causou uma redução significativa na DO para TH na

SNpc. Os resultados encontrados neste estudo foram previamente descritos (FERRAZ et al., 2003; XAVIER et al., 2005) e o presente trabalho confirma a neurotoxicidade da 6-OHDA sobre os neurônios dopaminérgicos da SNpc.

As mudanças na intensidade da imunorreação podem ser analisadas qualitativamente através de julgamento humano ou semi-quantitativamente através da densitometria óptica (XAVIER et al., 2005; CONTU; NELSON, 1994; HOWARD; REED, 1998; RASIA-FILHO et al., 2002). De fato, a análise densitométrica semi-quantitativa é mais acurada e discriminativa que o julgamento humano; a subjetividade das avaliações qualitativas é eliminada pela quantificação semi-automática (XAVIER et al., 2005).

Por outro lado, nossos dados indicaram um aumento significativo na DO para GFAP nos grupos lesionados. Entretanto, o grupo lesão treinado apresentou um aumento discreto quando comparado com o grupo lesão sedentário, sugerindo que o treinamento na esteira associado a lesão por 6-OHDA pode levar ao aumento da expressão da proteína GFAP. Outros estudos prévios descreveram uma ativação astrogial no sistema nigroestriatal ipsilateral após a infusão de pequena dose de 6-OHDA injetada unilateralmente no corpo estriado (GOMIDE; BIBANCOS; CHADI, 2005). Os mesmos autores reportaram uma reação astrocitária na via nigroestriatal ipsilateral após 3 semanas da lesão por 6-OHDA, com uma ligeira ativação também remanescente no septo ipsilateral e córtex piriforme (GOMIDE; SILVEIRA; CHADI, 2005).

Os animais lesionados apresentaram-se mais rígidos e mais cautelosos enquanto se moviam através da barra estreita. Muitos ratos iniciavam a travessia mas paravam, e então reiniciavam o movimento ou permaneciam estáticos, semelhante ao comportamento “freezing” observado em pacientes com DP.

Contudo, a lesão por 6-OHDA pareceu não ter efeito sobre o equilíbrio dos animais. Estes resultados estão de acordo com um estudo prévio publicado por Allbutt e Henderson (2007) onde os animais lesionados por 6-OHDA demonstraram um aumento de quatro vezes tanto na latência para iniciar a tarefa, como no tempo total para atravessar a barra, quando comparados com o grupo *sham*. Os autores também indicaram que o *narrow beam test* pode oferecer um meio útil pelo qual esses sintomas da DP podem ser quantificados em modelos animais.

Juntos estes resultados sugerem que a depleção de dopamina no estriado dorsal, como consequência da lesão no sistema nigroestriatal (mensurada pela DO para TH e pela rotação induzida por metilfenidato), resultou em aumento na latência e uma velocidade reduzida na travessia da barra estreita (tempo total), o que pode ser consistente com a acinesia e a bradicinesia previamente observadas tanto em modelos animais (ALLBUTT; HENDERSON, 2007; GERLACH; RIEDERER, 1996; LINDNER et al., 1999; SALAMONE et al., 1993) como em pacientes com DP (ALBIN et al., 1989; GERLACH; RIEDERER, 1996).

Efeitos do protocolo de treinamento

Antes e depois das 4 semanas do treinamento em esteira todos os animais foram submetidos ao TEM para determinar ambos os efeitos do treinamento e da lesão por 6-OHDA na performance dos ratos. O TEM realizado 2 dias após a cirurgia (pré-treino) não mostrou diferenças entre todos os grupos. Entretanto, ambos os grupos lesionados mostraram uma discreta redução na capacidade máxima de exercício (CME) 2 dias após a cirurgia quando comparados aos grupos *sham*, sugerindo que a lesão por 6-OHDA é capaz de afetar a performance dentro de poucos dias após a lesão.

Nossos resultados mostraram que o protocolo de treinamento usado neste estudo foi capaz de aumentar a CME nos grupos ST e LT quando comparados aos grupos sedentários (SS e LS respectivamente), indicando que o treinamento pode efetivamente aumentar a CME. Interessantemente, o treinamento causou um robusto aumento no grupo ST quando comparado ao grupo SS e um moderado aumento, embora significativamente diferente, quando comparado ao grupo LS. Parece que a lesão por 6-OHDA não permitiu um grande aumento na CME, visto que o grupo ST mostrou um aumento maior na CME que o grupo LS.

Por outro lado, o protocolo de treinamento na esteira foi capaz de melhorar os déficits do comportamento motor (redução significativa na latência e no tempo total) nos animais lesionados por 6-OHDA, enquanto que o treinamento não teve nenhum desses efeitos nos grupos sham. Estes resultados estão de acordo com dados prévios (TILLERSON et al., 2001; TILLERSON et al., 2003; O'DELL et al., 2007), indicando que o exercício é capaz de atenuar déficits motores no modelo de DP induzida por 6-OHDA.

No grupo LT nós encontramos uma tendência para o aumento da DO para GFAP quando comparado ao grupo LS. A ativação astrocitária é caracterizada por um aumento na expressão de GFAP (EDDLESTON; MUCKE, 1993) e achados sugerem um papel neuroprotetor para os astrócitos ativados na DP bem como em modelos experimentais de DP (TEISMANN; SCHULZ, 2004).

Muitas vias pelas quais os astrócitos podem proteger os neurônios dopaminérgicos foram relatadas: astrócitos aumentam a sobrevivência e a expressão do fenótipo de neurônios mesencefálicos em culturas, enquanto diminuí a morte apoptótica destas células (SORTWELL et al., 2000); eles podem "limpar" (*scavenge*) compostos tóxicos liberados por neurônios mortos e podem reduzir o

estresse oxidativo pela metabolização da dopamina, como eles expressam COMT (HIRSCH et al., 1999); astrócitos são capazes de prevenir a neurotoxicidade gerada pelo óxido nítrico por um mecanismo dependente de glutatona (CHEN et al. 2004).

Além disso, outra via pela qual os astrócitos podem proteger neurônios dopaminérgicos é a liberação do fator neurotrófico derivado da glia (glial cell line-derived neurotrophic factor - GDNF). GDNF tem mostrado ser um potente fator de sobrevivência para neurônios DA (LIN et al. 1993). Embora os níveis da proteína GDNF diminuam marcadamente após o desenvolvimento, há evidência de que GDNF pode aumentar com a experiência, como com o enriquecimento ambiental (YOUNG et al., 1999).

Cohen e cols. (2003), mostraram que se um “gesso” (*cast*) for colocado no membro ipsilateral durante os primeiros 7 dias seguidos da infusão de 6-OHDA, forçando o animal a usar seu membro contralateral, ambos os déficits comportamentais e neuroquímicos são reduzidos. Ademais, animais que receberam o “gesso” apenas unilateralmente tiveram um aumento na proteína GDNF no estriado correspondente ao membro mais usado, sugerindo que o uso forçado pré-lesão pode prevenir os déficits comportamentais e neuroquímicos resultantes da subsequente administração de 6-OHDA e que isto pode ser devido, em parte, aos efeitos neuroprotetores do GDNF.

Para ser efetivo, GDNF precisa agir em seu próprio complexo-receptor, assim iniciando uma cascata de sinalização que produz mudanças citoplasmáticas e/ou translacionais nos neurônios dopaminérgicos. Além disso, a cinase regulada por sinal extracelular (extracellular signal regulated kinase - ERK), um efetor do GDNF, tem mostrado ser ativada após o exercício, e permanece elevada por até 1 mês (SHEN et al., 2001).

Além do GDNF, o exercício, primariamente a corrida, tem mostrado aumentar outros fatores neurotróficos, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (brain-derived neurotrophic factor - BDNF), o fator de crescimento do nervo (nerve growth factor - NGF) (NEEPER et al., 1996), o fator de crescimento do fibroblasto tipo 2 (fibroblast growth factor-2 - FGF-2) (GOMEZ-PINILLA et al., 1995), e o fator de crescimento da insulina do tipo 1 (insulin-like growth factor 1 - IGF-1) (CARRO et al., 2001) em certas regiões do SNC, particularmente o hipocampo. Embora existam poucos resultados prévios sobre os efeitos do exercício em fatores tróficos no estriado, alguns desses fatores têm potente ação trófica nos neurônios DA (HYMAN et al., 1991; ALTAR et al., 1992; LIN et al., 1993; WINKLER et al., 1996). Portanto, parece provável que mais de um fator acabará por ser responsável pela proteção induzida pelo exercício. A este respeito, FGF-2, um dos fatores tróficos, mostrou ser regulado pelo exercício (GOMEZ-PINILLA et al., 1995), e tem também mostrado induzir a expressão de ambos GDNF e BDNF (SUTER-CRAZZOLARA; UNSICKER, 1996; KWON, 1997).

Em resumo, nossos dados sugerem que o exercício (corrida em esteira) melhora os déficits do comportamento motor neste modelo de DP induzida por 6-OHDA. Estes achados provêm mais evidências de que a fisioterapia pode ser benéfica para pacientes com DP. Além disso, nossos resultados mostraram que o exercício combinado com a 6-OHDA pode aumentar a expressão de GFAP no estriado dorsal, indicando que os astrócitos podem desempenhar um papel na produção dos efeitos benéficos do exercício na DP. Contudo, estes são os primeiros resultados que mostram um aumento na expressão de GFAP pós-exercício neste modelo animal e mais investigação é necessária para determinar a ação precisa do exercício sobre os astrócitos neste modelo de doença de Parkinson.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que o exercício físico é capaz de promover melhora nos déficits do comportamento motor em ratos submetidos ao modelo de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA. Além disso, o exercício físico foi capaz de aumentar a expressão da proteína GFAP no estriado dorsal em ratos lesionados por 6-OHDA.

Entretanto, os exatos mecanismos pelos quais o exercício físico exerce seus efeitos benéficos sobre o sistema nervoso central e, em especial, sobre o sistema nigroestriatal, ainda não foram completamente elucidados. Nossos resultados sugerem que um destes mecanismos pode ser a influência direta ou indiretamente causada pelo exercício físico sobre os astrócitos.

Como perspectivas, realizaremos novamente este experimento para possibilitar a mensuração da proteína S100b neste modelo, bem como sua modulação pelo exercício físico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOROGIANNIS, E.I.; AGOROGIANNIS, G.I.; PAPADIMITRIOU, A.; HADJIGEORGIOU, G.M. Protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 30: 215-224, 2004.

ALBIN, R.L.; MAKOWIEC, R.L.; HOLLINGSWORTH, Z.R.; DURE, L.S.; PENNEY, J.B.; YOUNG, A.B. Excitatory amino acid binding sites in the basal ganglia of the rat: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience.*, 46: 35-48, 1992.

ALTAR, C.A.; O'NEIL, S.; MARSHALL, J.F. Sensorimotor impairment and elevated levels of dopamine metabolites in the neostriatum occur rapidly after intranigral injection of 6-hydroxydopamine or gammahydroxybutyrate in awake rats. *Neuropharmacology.*, 23: 309-318, 1984.

ANDREW, R.; WATSON, D.G.; BEST, S.A.; MIDGLEY, J.M.; WENLONG, H.; PETTY, R.K. The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. *Neurochem. Res.*, 18: 1175-1177, 1993.

BAATILE, J.; LANGBEIN, W.E.; WEAVER, F.; MALONEY, C.; JOST, M.B. Effect of exercise on perceived quality of life of individuals with Parkinson's disease. *J. Rehabil. Res. Dev.*, 37: 529-534, 2000.

BALDERESCHI, M.; DICARLO, A.; VANNI, P.; et al. Life-Style related risk factors for Parkinson's disease: a population study. *Acta Neurol. Scand.*, 108: 234-244, 2003.

BARBOSA, E.R.; LIMONGI, J.C.; CUMMINGS, J.L. Parkinson's disease. *Psychiatr. Clin. North. Am.*, 20: 769-790, 1997.

BARBOSA, M.T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D.P.; et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambui study). *Mov. Disord.*, 21: 800-808, 2006.

BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2: 325-334, 2001.

BERGEN, J.L.; TOOLE, T.; ELLIOTT, R.G.; WALLACE, B.; ROBINSON, K.; MAITLAND, C.G. Aerobic exercise intervention improves aerobic capacity and movement initiation in Parkinson's disease patients. *NeuroRehabilitation.*, 17: 161-168, 2002.

BERGER, K.; PRZEDBORSKI, S.; CADET, J.L. Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. *Brain. Res. Bull.*, 26: 301-307, 1991.

BETARBET, R.; SHERER, T.B.; GREENAMYRE, J.T. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays.*, 24: 308-318, 2002.

BETARBET, R., TURNER, R., CHOCKLAN, V., DELONG, M.R., ALLERS, K.A., WALTERS, J., LEVEY, A.I., GREENAMYRE, J.T. Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J. Neurosci.*, 17: 6761-6788, 1997.

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

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A.L.; SADOUL, R.; VERNA, J.M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.*, 65: 135-172, 2001.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx.*, 2: 484-494, 2005.

CANTERAS, N.S., SHAMMAH-LAGNADO, S.J., SILVA, B.A., RICARDO, J.A. Aferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res.*, 513: 43-59, 1990.

CARLSSON, A. Selective protection of 5-hydroxytryptamine store against the action of reserpine by treatment with 5-hydroxytryptophan. *J. Pharm. Pharmacol.*, 19: 783-784, 1967.

CENCI, M.A.; WHISHAW, I.Q.; SCHALLERT, T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat. Rev. Neurosci.*, 3: 574-579, 2002.

COHEN, A.D.; TILLERSON, J.L.; SMITH, A.D.; SCHALLERT, T.; ZIGMOND, M.J. Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. *Neurochem.*, 85: 299-305, 2003.

COSSETTE, M., LEVESQUE, M., PARENT, A. Extrastriatal dopaminergic innervation of human basal ganglia. *Neurosci. Res.*, 34: 51-54, 1999.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C.; CHRISTIE, L. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *TRENDS in Neurosciences.*, 30: 464-472, 2007.

CRIZZLE, A.M.; NEWHOUSE, I.J. Is Physical Exercise Beneficial for Persons with Parkinson's Disease? *Clin. J. Sport Med.*, 16: 422-425, 2006.

DAHL, D. Isolation and initial characterization of glial fibrillary acidic protein from chicken, turtle, frog, and fish central nervous system. *Biochem. Biophys. Acta.*, 446: 41-50, 1976.

DAMIER, P.; HIRSCH, E.C.; ZHANG, P.; AGID, Y.; JAVOY-AGID, F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience.*, 52: 1-6, 1993.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.*, 39: 889-909, 2003.

DELAU, L.M., BRETELER, M.B. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, 5: 525-535, 2006.

DONG, Y.; BENVENISTE, E.N. Immune Function of Astrocytes. *Glia.*, 36: 280-190, 2001.

EBLAN, M.J.; WALKER, J.M.; SIDRANSKI, E. The glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.*, 352: 728-731, 2005.

ENG, F., GHIRNIKAAR, R.S., LEE, Y.L. Glial Fibrillaary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem.*, 25: 1439-51, 2000.

FARRER, M.J. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nature.*, 7: 306-318, 2006.

FAULL, R.L.; LAVERTY, R. Changes in dopamine levels in the corpus striatum following lesions in the substantia nigra. *Exp. Neurol.*, 23: 332-340, 1969.

FERRE, S.; O'CONNOR, W.T.; FUXE, K.; UNGERSTEDT, U. The striopallidal neuron: a main locus for adenosine-dopamine interactions in the brain. *J. Neurosci.*, 13: 5402-5406, 1993.

FINGER, S. Some movement disorders. In: Finger S. *Origins of Neuroscience. A History of Explorations into Brain Function*, New York, Oxford University, 1994.

FLORES, G., LIANG, J.J., SIERRA, A., MARTINEZ-FONG, D., QUIRION, R., ACEVES, J., SRIVASTAVA, L.K. Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience.*, 91: 549-556, 1999.

FORNO, L.S.; DELANNEY, L.E.; IRWIN, I.; DI MONTE, D.; LANGSTON, J.W. Astrocytes and Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.*, 94: 429-436, 1992.

FUJIMOTO, K., KITA, H. Response characteristic of subthalamic neurons to the stimulation of the sensorimotor cortex in the rat. *Brain Res.*, 609: 185-192, 1993.

GARCIA RUÍZ, P.J. Breve historia de la L-Dopa. *Neurologia.*, 17: 214-217, 2002.

GERFEN, C.R., KEEFE, K.A., GAUDA, E.B. D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J. Neurosci.*, 15: 8167-876, 1995.

GIULIAN, D.; WOODWARD, J.; YOUNG, D.G.; KREBS, J.F.; LACHMAN, L.B. Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J. Neurosci.*, 8: 2485-2490, 1988.

GREENAMYRE, J.T.; HASTINGS, T.G. Parkinson's - divergent causes, convergent mechanisms. *Science.*, 304: 1120-1122, 2004.

GOEDERT, M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2: 492-495, 2001.

GOMIDE, V.C.; CHADI, G. Glial bFGF And S100 Immunoreactivities Increase in Ascending Dopamine Pathways Following Striatal 6-OHda-Induced Partial Lesion of The Nigrostriatal System: A Stereological Analysis. *Inter. J. Neurosci.*, 115: 537-555, 2005.

GOODWIN, V.A.; RICHARDS, S.H.; TAYLOR, R.S; TAYLOR, A.H.; CAMPBELL, J.L. The effectiveness of exercise interventions for people with Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.*, 23: 631-640, 2008.

GORDON, M.N.; SCHREIER, W.A.; OU, X.; HOLCOMB, L.A.; MORGAN, D.G. Exaggerated astrocyte reactivity after nigrostriatal deafferentation in the aged rat. *J. Comp. Neurol.*, 388: 106-119, 1997.

HAUBER, W. Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Progr. Neurobiol.*, 56: 507-540, 1998.

HAUSMANN, R., RIEB, R., FIEGUTH, A., BETZ, P. Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *Int. J. Legal Med.*, 113: 70-75, 2000.

HEALY, D.G., ABOU-SLEIMAN, P.M., WOOD, N.W. PINK, PANK, or PARK? A clinician's guide to familial parkinsonism. *Lancet Neurol.*, 3: 652-662, 2004.

HERMANN, M., VOS, P., WUNDERLICH, M.T., BRUJIN, C., LAMERS, K.J.B. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke. A comparative analysis of serum concentrations of protein S100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke.*, 31: 2670-2677, 2000 .

HERMAN, T.; GILADI, N.; GRUENDLINGER, L.; HAUSDORFF, J.M. Six Weeks of Intensive Treadmill Training Improves Gait and Quality of Life in Patients With Parkinson's Disease: A Pilot Study. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 88: 1154-1158, 2007.

HORNYKIEWICZ, O. How L-dopa was discovered as a drug for a Parkinson's disease 40 years ago. *Wien Klin Wochenschr.*, 113: 855-862, 2001.

HERRERO, M.T., BARCIA, C., NAVARRO, J.M. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Child's Nerv. Syst.*, 18 :386-404, 2002.

JANKOVIC, J. Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease. *Neurology.*, 64: 2021-2028, 2005.

JEON, B.S.; JACKSON-LEWIS, V.; BURKE, R.E. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration.*, 4: 131-137, 1995.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, T.M. Princípios da neurociências. Manole., 4^a ed., 853-867, 2002.

KLEIN, C. Implications of genetics on the diagnosis and care of patients with Parkinson's disease. Arch. Neurol., 63: 328-342, 2006.

KAPP, W. The history of drugs for the treatment of Parkinson's disease. J. Neural Transm. Suppl., 38: 1-6, 1992.

KULTAS-ILINSKY, K.; LEONTIEV, V.; WHITING, P.J. Expression of 10 GABAA receptor subunit messenger RNAs in the motor-related thalamic nuclei and basal ganglia of Macaca Mulatta studied with in situ hybridization histochemistry. Neuroscience., 85: 179-204, 1998.

LIEDTKE, W.; EDELMANN, W.; BIERI, P.L.; CHIU, F.; COWAN, N.J.; KUCHERLAPATI, R. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. Neuron., 17: 607-615, 1996.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine vesicles and α -synuclein. Nat. Rev. Neurosci., 3: 932-942, 2002.

LUTHMAN, J.; FREDRIKSSON, A.; SUNDSTROM, E.; JONSSON, G.; ARCHER, T. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal

rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav. Brain Res.*, 33: 267-277, 1989.

MARSHALL, J.F.; TURNER, B.H.; TEITELBAUM, P. Sensory neglect produced by lateral hypothalamic damage. *Science.*, 174: 523-525, 1971.

MCINERNEY-LEO, A., HADLEY, D.W., GWINN-HARDY, K., HARDY J. Genetic testing in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 20: 1-10, 2005.

MIYAI, I.; FUJIMOTO, Y.; UEDA, Y.; YAMAMOTO, H.; NOZAKI, S.; SAITO, T.; ANG, J. Treadmill training with body weight support: its effect on Parkinson's disease. *Arch Phys Med Rehabil.*, 81(7): 849-852, 2000.

MIYASAKI J.M.; SHANNON, K.; VOON V.; et al. Practice parameter: evaluations and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson's disease (an evidence-based review). *Neurology.*, 66: 996-1002, 2006.

NICHOLLS, N.R., DAY, J.R., LAPING, N.J., JOHNSON, S.A., FINCH, C.E. GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol Aging.*, 14: 421-429, 1993.

NIEUWBOER, A.; DE WEERDT, W.; DOM, R.; TRUYEN, M.; JANSSENS, L.; KAMSMA, Y. The effect of a home physiotherapy program for persons with Parkinson's disease. *J Rehabil Med.*, 33(6): 266-272, 2001.

O'DELL, S.J.; GROSS, N.B.; FRICKS, A.N.; CASIANO, B.D.; NGUYEN, T.B.; MARSHALL, J.F.; Running Wheel Exercise Enhances Recovery From Nigrostriatal Dopamine Injury Without Inducing Neuroprotection. *Neuroscience.*, 144: 1141-1151, 2007.

PALMER, S.S.; MORTIMER, J.A.; WEBSTER, D.D.; BISTEVINS, R.; DICKINSON, G,L.; Exercise therapy for Parkinson's disease. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, 67: 741-745, 1986.

PARENT, A., HAZRATI, L.N. Functional anatomy of the basal ganglia. Part I: The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. *Brain Res. Rev.*, 20: 91-127, 1995.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. Whittingham and Rowland, London, 1817.

PASINETTI, G.M.; HASSLER, M.; STONE, D.; FINCH, C.E. Glial gene expression during aging in rat striatum and in long-term responses to 6-OHDA lesions. *Synapse.*, 31: 278-284, 1999.

PEARCE, J.M.S. History of Parkinson's disease. In: Pearce JMS. Parkinson's disease and Its Management, Oxford, Oxford University Press., 4-12, 1992.

PERESE, D.A.; ULMAN, J.; VIOLA, J.; EWING, S.E.; BANKIEWICZ, K.S. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res.*, 494: 285-293, 1989.

POLYMEROPOULOS, H., LAVEDAN, C., LEROY, E. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.*, 276: 2045-2047, 1997.

POULTON, N.P.; MUIR, G.D. Treadmill training ameliorates dopamine loss but not behavioral deficits in hemi-Parkinsonian rats. *Experimental Neurology.*, 193: 181-197, 2005.

PRZEDBORSKI, S.; ISCHIROPOULOS, H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signaling.*, 7: 685-693, 2005.

PRZEDBORSKI, S.; LEVIVIER, M.; JIANG, H.; FERREIRA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; DONALDSON, D.; TOGASAKI, D.M. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience.*, 67: 631-647, 1995.

PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. *Neurociências, Artmed*, 2^a ed., 391-407, 2005.

RODNIGHT R., GONÇAALVES C.A., WOFCHUK S.T., LEAL R. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key in astrocytic plasticity. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30: 1-14, 1997.

RODRIGUES, R.W.; GOMIDE, V.C.; CHADI, G. Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine. *Int. J. Neurosci.*, 109: 91-126, 2001.

ROPPER, A.H.; BROWN, R.H. *Adams and Victor's Principles of Neurology*. 8th edition, New York: McGraw-Hill, 2005.

ROSIN, D.L., HETTINGER, B.D., LEE, A., LINDEN, J. Anatomy of adenosine A2A receptors in brain: morphological substrates for integration of striatal function. *Neurology.*, 61: 12-18, 2003.

SCHALLERT, T.; FLEMING, S.M.; LEASURE, J.L.; TILLERSON, J.L.; BLAND, S.T.; CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology.*, 39: 777-787, 2000.

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

SHENG, J.G.; SHIRABE, S.; NISHIYAMA, N.; SCHWARTZ, J.P. Alterations in striatal glial fibrillary acidic protein expression in response to 6-hydroxydopamine-induced denervation. *Exp. Brain. Res.*, 95: 450-456, 1993.

SHAPIRA, A.H.V. Etiology of Parkinson's disease. *Neurology.*, 66: 10-23, 2006.

SHERER, T.B., BETARBET, R., GREENAMYRE, J.T. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *The Neuroscientist.*, 8: 192-196, 2002.

SMITH, A.D.; ZIGMOND, M.J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from a animal model of parkinsonism. *Experimental Neurology.*, 184: 31-39, 2003.

SMITH Y, BEVAN MD, SHINK E, BOLAM JP. Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience.*, 86: 353-871, 1998.

SPILLANTINI, M.G., SCHMIDT, M.L., LEE V.M.Y., TROJANOWSKI, J.Q., JAKES, R., GOEDERT, M. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature.*, 388: 839-840, 1997.

SPILLANTINI MG, CROWTHER RA, JAKES R, HASEGAWA M, GOEDERT M. α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 6469-6473, 1998.

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

TILLERSON, J.L.; COHEN, A.D.; PHILHOWER, J.; MILLER, G.W.; ZIGMOND, M.J.; SCHALLERT, T. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. *J. Neurosci.*, 21: 4427-4435, 2001.

TOLOSA, E.; WENNING, G.; POEWE, W. The diagnosis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.*, 5: 75-86, 2006.

UNGERSTEDT, U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.*, 367: 49-68, 1971.

VALENTE, E.M.; ABOU-SLEIMAN, P.M.; CAPUTO, V., et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK-1. *Science.*, 304: 1158-1160, 2004.

VAN DEN EEDEN S.K.; TANNER C.M.; BERSTEIN A.L; et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am. J. Epidemiol.*, 157: 1015-1022, 2003.

WARNER, T.T., SCHAPIRA, A.H. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 53: 16-25, 2003.

WIRDEFELDT, K., GATZ, M., SCHANING, M., PEDERSEN, N.L. No evidence for heritability of Parkinson's disease in Swedish twins. *Neurology.*, 63: 305-311, 2004.

WRIGHT, D.E., SEROOGY, K.B., LUNDGREN, K.H., DAVIS, B.M., JENNES, L. Comparative localization of serotonin 1A, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 351: 357-373, 1995.

YUNG, K.K.L., BOLAM, J.P., SMITH, A.D., HERSCH, S.M., CILIAIX, B.J., LEVEY, A.I. Immunocytochemical localization of D1 and D2 dopamine receptors in the basal ganglia of the rat: light and electron microscopy. *Neuroscience.*, 65: 709-730, 1995.

ZIMPRICH, A., BISKUP, S., LEITNER, P. et al. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron.*, 44: 601-607, 2004.