

Universidade Federal de
Santa Catarina

Programa de Pós-
Graduação em
Neurociências

[http://ppgneuro.posgrad.
ufsc.br/](http://ppgneuro.posgrad.ufsc.br/)

Campus Universitário
Florianópolis- SC

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
para obtenção do título de Doutora em
Neurociências.

Orientador: Rui Daniel Schröder Prediger

Florianópolis, 2018

O exercício físico reduz as discinesias induzidas por L-DOPA: investigação da neuroproteção e das modificações na metaplasticidade estriatal - Ana Elisa Speck Aguiar

O exercício físico reduz as discinesias induzidas por L-
DOPA: investigação da neuroproteção e das modificações
na metaplasticidade estriatal

Ana Elisa Speck Aguiar

Estudo sobre os
efeitos do exercício
físico em esteira
sobre as discinesias
induzidas por L-
DOPA

Orientador: Rui
Daniel Schröder
Prediger



Ana Elisa Speck Aguiar

**O EXERCÍCIO FÍSICO REDUZ AS DISCINESIAS INDUZIDAS
POR L-DOPA: INVESTIGAÇÃO DA NEUROPROTEÇÃO E DAS
MODIFICAÇÕES NA METAPLASTICIDADE ESTRIATAL**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Neurociências
da Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do título de
Doutora em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel
Schröder Prediger

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da
UFSC.

Aguiar, Ana Elisa Speck

O exercício físico reduz as discinesias induzidas por L-DOPA:
investigação da neuroproteção e das modificações na
metaplasticidade estriatal / Ana Elisa Speck Aguiar; orientador, Rui
Daniel Schröder Prediger, 2018.

143 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Neurociências. 2. Exercício. 3. Doença de Parkinson. 4.
Discinesias. 5. Plasticidade córtico estriatal. I. Prediger, Rui Daniel
Schröder . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Neurociências. III. Título.

“O exercício físico reduz as discinesias induzidas por L-DOPA: investigação da neuroproteção e das modificações na metaplasticidade estriatal”

Por

Ana Elisa Speck Aguiar

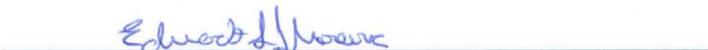
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (025/2018/PGN) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências - UFSC.


Prof.(a) Dr.(a) Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Banca examinadora:


Dr.(a) Rui Daniel Schröder Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)


Dr.(a) Mariza Bortolanza (participação por videoconferência)
(Universidade de São Paulo)


Dr.(a) Eduardo Luiz Gasnhar Moreira (Universidade Federal de Santa Catarina)


Dr.(a) Daniel Fernandes Martins (Universidade do Sul de Santa Catarina)

Florianópolis, 21 de setembro de 2018.

Dedico esta tese aos meus pais Maria Nazaré e Adalberto Speck, e ao meu marido Aderbal Silva Aguiar Júnior.

AGRADECIMENTOS

A minha família, meus pais Maria Nazaré e Adalberto, obrigada pelo apoio, segurança, incentivo, paciência, dedicação e responsabilidade com a minha formação. Ao meu marido Aderbal que percorreu todos esses momentos comigo, além do auxílio técnico e científico, pela parceria, amizade e carinho que tem dedicado a mim.

Ao Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger, por acreditar e investir constantemente em mim e no meu trabalho. Mas principalmente obrigado pela confiança e por toda a brilhante orientação no decorrer do doutorado, sem ele com certeza nada disso seria possível.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Antunes da Cunha, do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra/Portugal (CNC), onde realizei meu estágio sanduíche no exterior, pela gentil recepção em seu laboratório, pela orientação e colaboração no desenho de alguns experimentos que compõem esta tese. A Dra. Paula Canas, Dra. Paula Agostinho e Dra. Samira Ferreira, por todo o aprendizado e orientações neste período de estágio. E ao Professor Dr. Ângelo Tomé e ao Dr. Francisco Silva por todos ensinamentos nas técnicas de eletrofisiologia.

Aos membros da banca Dra. Mariza Bortolanza, Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica – USP e ao professor Dr. Daniel Fernandes Martins do PPG em Ciências da Saúde – UNISUL (membro da banca do meu mestrado também), que aceitaram compor a banca como membros externos ao programa. E ao professor Dr. Eduardo Luiz Gasnhar Moreira Departamento de Ciências Fisiológicas – UFSC, pelo aceite nesta etapa da defesa, após valiosa contribuição na qualificação. A professora Dra. Leidiane Mazzardo Martins Departamento de Ciências Morfológicas - UFSC, com quem realizei minha disciplina de docência orientada, e que tenho muita admiração.

A todos os colegas do LEXDON, especialmente a Marissa Giovanna Schamme, Angela Patricia Franca, Samanta de Oliveira Lopes, Tuane Sampaio Correia e Filipe Carvalho Matheus. Aos colegas do CNC, especialmente a Marlene Pereira e Daniel Moreira e demais colegas e alunos de iniciação científica que não foram citados. Pelo ambiente de trabalho de alto nível e auxílio fundamental em alguns experimentos que compõem esta tese.

“Faça as coisas mais difíceis enquanto são fáceis e faça as grandes enquanto são pequenas. Uma jornada de 1000 milhas deve começar com um único passo.”

Lao-Tsé

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que afeta aproximadamente 1% da população acima de 65 anos. A doença tem caráter progressivo associada inicialmente a sintomas não motores seguidos de sintomas motores. Desde a descrição da doença existe uma crescente busca de terapias farmacológicas e não farmacológicas visando minimizar os seus sinais e sintomas. O tratamento com L-DOPA, iniciado na década de 1960, continua sendo o principal fármaco usado para o alívio dos sintomas motores da DP. Entretanto, após o tratamento crônico durante 3-5 anos, é observada uma perda da eficácia clínica da L-DOPA e o aparecimento de efeitos colaterais, destacando-se as discinesias induzidas por L-DOPA (LIDs). As LIDs representam um grande desafio para a comunidade médica e acadêmica, que procuram uma maior compreensão de seus mecanismos e a busca por agentes antidiscinéticos. Nas últimas duas décadas, um número crescente de trabalhos clínicos e experimentais em modelos animais tem sugerido o potencial do exercício físico como um agente paliativo ou adjuvante na DP. A principal contribuição científica dos resultados desta tese é demonstrar que o exercício físico em esteira pode reduzir as LIDs em camundongos. Entretanto, este efeito é dependente da dose de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) utilizada para a indução do modelo de DP, linhagem de camundongos, tipo e intensidade do exercício. No primeiro bloco experimental foi realizada uma curva dose-resposta de L-DOPA em camundongos *Swiss* albinos, e foi determinada que a dose de 50 mg/kg seria suficiente para induzir um alto escore de LIDs. No segundo bloco experimental, o protocolo de quatro semanas de exercício físico em esteira em camundongos *Swiss* albinos injetados unilateralmente com 6-OHDA (10 µg) no estriado dorsolateral foi capaz de diminuir o escore de LIDs e melhorar o comportamento motor, avaliado nos testes do cilindro, de exaustão e no rotarod. Através da técnica de Western blot, foi observado nesses animais um aumento no imunocontéudo estriatal dos marcadores dopaminérgicos tirosina hidroxilase (TH) e transportador de dopamina (DAT) e do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF). No terceiro bloco experimental, o protocolo de quatro semanas de exercício físico em esteira em camundongos C57BL/6 injetados unilateralmente com 6-OHDA (12 µg) no estriado dorsolateral reduziu o escore de discinesias e atenuou os prejuízos motores dos

animais no teste do cilindro. No entanto, o exercício físico não reverteu as alterações de plasticidade cortico-estriatal observadas em animais discinéticos, bem como não alterou a redução do imunocontéudo de TH no estriado lesionado com 6-OHDA. Por fim, os resultados de experimentos de eletrofisiologia cortico-estriatal em fatias de animais *naive* mostraram que a dopamina na concentração de 50 μ M modificou o padrão de plasticidade para LTP, semelhante aos animais tratados cronicamente com L-DOPA. Em conjunto, os resultados desta tese indicam o potencial do exercício físico como um agente modificador das LIDs em animais hemiparkinsonianos, além de diminuir os comprometimentos motores. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar o envolvimento de mecanismos neuroprotetores e modificações na plasticidade cortico-estriatal nos efeitos antidiscinéticos do exercício físico.

Palavras-chave: Exercício físico; doença de Parkinson; 6-OHDA; L-DOPA; discinesias; plasticidade córtico-estriatal; neuroproteção.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease that affects approximately 1% of the population over 65 years. The progression of PD is initially associated with non-motor symptoms followed by motor symptoms. Since the first description of the disease there is an increasing interest for pharmacological and non-pharmacological agents to counteract PD signs and symptoms. L-DOPA treatment, which began in the 1960s, is still the main drug used in the treatment of PD. However, after the chronic treatment with L-DOPA during 3-5 years, there is a decrease of L-DOPA efficacy and the appearance of relevant side effects including the L-DOPA-induced dyskinesia (LIDs). Over the last two decades, a growing number of clinical and experimental studies have suggested the potential of physical exercise as a palliative or adjunctive agent in PD. The results of this thesis demonstrate that physical exercise on treadmill can reduce LIDs. However, the antidyskinetic effects of exercise are dependent of the 6-OHDA dose, mouse strain and type and intensity of exercise. We first performed a dose-response curve of L-DOPA in Swiss albino mice, and it was determined that the dose of 50 mg/kg would be sufficient to induce a high LID score. In the second experimental block, the protocol of four weeks in treadmill exercise in Swiss albino hemiparkinsonian mice (6-OHDA, 10 μ g), was able to decrease the LID score and improved motor behavior in the cylinder, maximal load and rotarod tests. Western blot analysis also revealed increased TH, DAT and GDNF density in the striatum of exercised mice. In a third experimental block, in C57BL/6 hemiparkinsonian mice (6-OHDA, 12 μ g) the treadmill exercise protocol was able to decrease the dyskinesia score, improve motor behavior in cylinder test, but did not reverse the corticostriatal plasticity alterations observed in dyskinetic animals. Immunohistochemistry analysis revealed that, differently from the first model, exercise failed to protect against the reduction of striatal TH immunoccontent. Interestingly, corticostriatal electrophysiology experiments on slices of naive animals showed that dopamine, at 50 μ M, modified the plasticity pattern for LTP, similar to animals treated chronically with L-DOPA. These results reinforce the potential of physical exercise as a modifying agent in PD, attenuating LIDs and motor impairments in hemiparkinsonian mice. However, further studies are necessary to confirm the role of

neuroprotective and corticostriatal plasticity mechanisms in the antidyskinetic effects of exercise.

Keywords: Exercise; Parkinson's disease; 6-OHDA; L-DOPA; dyskinesias; corticostriatal plasticity; neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Degeneração dopaminérgica e formação e distribuição dos corpos de Levy observados na doença de Parkinson.....	26
Figura 2 – Ilustração das alterações da circuitaria dos núcleos da base observadas na doença de Parkinson.	28
Figura 3 – Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson.....	32
Figura 4 – Subdivisões clínicas das discinesias induzidas por L-DOPA.....	38
Figura 5 – Circuitos neuronais dos núcleos da base afetados na DP e nas LIDs.	40
Figura 6 – Representação esquemática dos processos de plasticidade sináptica estriatal de LTD e LTP.	43
Figura 7 – Alterações na plasticidade estriatal que levam ao desenvolvimento das discinesias induzidas por L-DOPA em modelos animais.....	45
Figura 8 – Experimento 1: Modelo experimental de LIDs em camundongos <i>Swiss</i> albinos.	67
Figura 9 – Experimento 2: Efeitos do exercício físico em esteira sobre as LIDs em camundongos <i>Swiss</i> albinos.....	68
Figura 10 – Desenho experimental 3: Parâmetros eletrofisiológicos estriatais em camundongos C57BL/6 com discinesias induzidas por L-DOPA submetidos ao exercício físico em esteira.	70
Figura 11 - Testes para avaliação da assimetria (esquerda) e coordenação motora (direita).	71
Figura 12 – Esteira ergométrica adaptada para camundongos e parâmetros de exercício físico utilizados.	73
Figura 13 – Esteira ergométrica e equipamento utilizado para determinar o VO ₂ máximo.	74
Figura 14 – Aparatos utilizados para experimentos dos desafios farmacológicos.	75
Figura 15 – Cortes coronais de fatias estriatais.....	79

Figura 16 – Imagem do sistema de eletrofisiologia extracelular utilizado.....	80
Figura 17 – Número de rotações contralaterais avaliadas semanalmente após a injeção unilateral intra-estriatal de 6-OHDA.	83
Figura 18 – Escore total de discinesias induzidas por diferentes doses de L-DOPA.....	85
Figura 19 – Número de rotações contralaterais à lesão com 6-OHDA induzidas por apomorfina e efeito do exercício físico sobre as discinesias induzidas por L-DOPA.	87
Figura 20 – Efeitos do tratamento com amantadina sobre as LIDs em animais sedentários e exercitados, comparação do 28º dia de tratamento com o 30º dia.	89
Figura 21 – Efeitos do tratamento com L-DOPA e exercício físico sobre os prejuízos motores induzidos pela lesão com 6-OHDA em camundongos <i>Swiss</i> albinos.	91
Figura 22 – Efeitos do exercício físico e do tratamento com L-DOPA sobre o desempenho de camundongos hemiparkinsonianos avaliados no teste de exaustão em esteira.	92
Figura 23 – Efeitos do exercício físico e do tratamento com L-DOPA sobre o desempenho de camundongos hemiparkinsonianos avaliados no teste do rotarod.	93
Figura 24 – Efeitos do exercício físico sobre o imunoconteúdo da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado controle (contralateral) ou lesionado com 6-OHDA de camundongos tratados durante 4 semanas com L-DOPA.	94
Figura 25 – Efeitos do exercício físico sobre o imunoconteúdo do transportador de dopamina (DAT) no estriado controle (contralateral) ou lesionado com 6-OHDA de camundongos tratados durante 4 semanas com L-DOPA.	95
Figura 26 – Efeitos do exercício físico sobre o imunoconteúdo do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) no estriado controle (contralateral) ou lesionado com 6-OHDA de camundongos tratados durante 4 semanas com L-DOPA.	96

Figura 27 – Número de rotações induzidos pela administração de R(-)-apomorfina em camundongos C57BL/6 lesionados com 6-OHDA.....	97
Figura 28 – VO ₂ máximo alcançado após a habituação em esteira e determinação do protocolo de treinamento.....	98
Figura 29 – Efeitos do exercício em esteira durante 4 semanas sobre o escore total e subtipos de discinesias induzidas por L-DOPA em camundongos C57BL/6 lesionados com 6-OHDA.....	99
Figura 30 – Efeitos do tratamento com L-DOPA e exercício físico sobre os prejuízos motores induzidos pela lesão em camundongos C57BL/6.....	101
Figura 31 – Avaliação de parâmetros eletrofisiológicos córtico-estriatal dorsolateral em camundongos C57BL/6 discinéticos sedentários e exercitados.....	102
Figura 32 – Efeitos do exercício físico sobre a degeneração dopaminérgica estriatal induzida pela micro-injeção de 6-OHDA em camundongos C57BL/6.....	104
Figura 33 – O tratamento com a dopamina em fatias estriatais altera a plasticidade semelhante ao tratamento crônico com L-DOPA/benserazida.....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Tratamento farmacológico dos sintomas motores da DP	32
Quadro 2 – Sumário dos fármacos em estudos clínicos para o tratamento das discinesias induzidas por L-DOPA.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos do exercício físico em pacientes com a DP.	53
Tabela 2 – Exercício físico em modelos animais da DP.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-OM-DOPA – 3-O-Metil-DOPA
6-OHDA – 6-hidroxidopamina
ACh – acetilcolina
ACSF – fluido cérebro-espinhal artificial
ANOVA – análise de variância
BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE – barreira hematoencefálica
CDK5 – quinase 5 dependente de ciclina
COMT – catecol-O-metil-transferase
COMTi – inibidores da catecol-O-metil-transferase
D1 – receptor dopaminérgico do tipo D1
D2 – receptor dopaminérgico do tipo D2
DA – dopamina
DARPP-32 – fosfoproteína regulada por DA e AMPc de 32 kDa
DAT – transportador de dopamina
DP – doença de Parkinson
DCAA – enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos
ERK – cinases reguladas por sinal extracelular
Exe – exercício
GDNF – fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia
GFR α 1-RET – receptor alfa-1 da família GDNF
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HFS – estimulação de alta frequência
kDa – quilodalton
LIDs – discinesias induzidas por L-DOPA
LFS – estimulação de baixa frequência
LTD – depressão de longa duração
LTP – potenciação de longa duração
MAO-B – monoamino oxidase B
MAO-Bi – inibidores da monoamina oxidase do tipo B
MSNs – neurônios espinhais médios
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NB – núcleos da base
mTORC1 – proteína alvo da rapamicina em mamíferos
mRNAs – RNA mensageiro
NMDA – receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-Aspartato
NO – óxido nítrico

PKA – proteína kinase A
PKG – proteína kinase G
P-MSK1-cinases de proteína quinase ativadas por mitógeno
PP1- proteína fosfatase 1
Sed – sedentário
SN – substantia nigra
SNC – sistema nervoso central
SNpc – parte compacta da substância negra
SNpr – parte reticulada da substância negra
TE – teste de exaustão
TH – tirosina hidroxilase
UPDRS – Unified Parkinson’s Disease Rating Scale
VO₂max – consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	DOENÇA DE PARKINSON	23
1.2	TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DP.....	28
1.3	DISCINESIAS INDUZIDAS POR L-DOPA (LIDs) 35	
1.4	MECANISMOS DAS LIDs	39
1.5	MODIFICAÇÕES DA PLASTICIDADE ESTRIATAL CAUSADAS PELAS LIDs.....	41
1.6	TRATAMENTO DAS LIDs	46
1.7	O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DOENÇA DE PARKINSON E NAS LIDs	51
1.7.1	Exercício físico em pacientes com a DP	51
1.7.2	Exercício físico em modelos animais da DP	54
1.7.3	Exercício físico e fatores neurotróficos: importância do GDNF	59
1.7.4	Efeitos do exercício físico sobre as LIDs	61
1.8	OBJETIVOS.....	63
1.8	Objetivo geral	63
1.8.2	Objetivos específicos	64
2	MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1	ANIMAIS.....	65
2.2	DROGAS	65
2.3	DESENHOS EXPERIMENTAIS	66
2.3.1	Bloco experimental 1 – Avaliação dose-resposta das LIDs em camundongos <i>Swiss</i> albinos	66
2.3.2	Bloco experimental 2 – Efeitos do exercício físico em esteira sobre as LIDs em camundongos <i>Swiss</i> albinos	67

2.3.3 Bloco experimental 3 – Investigação de parâmetros eletrofisiológicos córtico-estriatal de camundongos C57BL/6 com LIDs e submetidos a exercício físico em esteira 69

2.4	TESTES COMPORTAMENTAIS	70
2.4.1	Cilindro	70
2.4.2	Rotarod.....	71
2.4.3	Teste de exaustão	72
2.4.4	Treino em esteira	73
2.4.5	Teste de VO ₂ máximo.....	73
2.5	DESAFIOS FARMACOLÓGICOS	74
2.5.1	Rotações induzidas por R(-)-apomorfina	74
2.5.2	Discinesias induzidas pela L-DOPA.....	75
2.6	EXPERIMENTOS BIOQUÍMICOS	76
2.6.1	Imunodeteção de proteínas	76
2.6.2	Imunohistoquímica.....	77
2.7	ELETFISIOLOGIA EXTRACELULAR CÓRTICO-ESTRIATAL	78
2.7.1	Eletrofisiologia extracelular córtico-estriatal de animais discinéticos sedentários e exercitados.....	78
2.7.2	Eletrofisiologia extracelular córtico-estriatal com diferentes concentrações de dopamina	81
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	82
3	RESULTADOS	83
3.1	PADRONIZAÇÃO DAS DISCINESIAS INDUZIDAS POR L-DOPA (LIDs) EM CAMUNDONGOS SWISS ALBINOS.....	83

3.2	EFEITOS ANTIDISCINÉTICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ESTEIRA EM CAMUNDONGOS SWISS ALBINOS	85
3.3	EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM L-DOPA ASSOCIADA AO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ASSIMETRIA MOTORA DE CAMUNDONGOS HEMIPARKINSONIANOS	90
3.4	EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O DESEMPENHO E A COORDENAÇÃO MOTORA DE ANIMAIS DISCINÉTICOS	91
3.5	EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ESTEIRA SOBRE O IMUNODETECÇÃO DE TIROSINA HIDROXILASE (TH) NO ESTRIADO DE CAMUNDONGOS DISCINÉTICOS	93
3.6	EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ESTEIRA SOBRE O IMUNOCONTEÚDO DO TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT) NO ESTRIADO DE CAMUNDONGOS DISCINÉTICOS	94
3.7	EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ESTEIRA SOBRE O IMUNOCONTEÚDO DO GDNF NO ESTRIADO DE CAMUNDONGOS DISCINÉTICOS.....	95
3.8	CONFIRMAÇÃO FARMACOLÓGICA DA LESÃO POR INJEÇÃO INTRA-ESTRIATAL DE 6-OHDA EM CAMUNDONGOS C57BL/6	96
3.9	ERGOESPIROMETRIA E PROTOCOLO DE TREINAMENTO.....	97
3.11	EFEITOS DO TRATAMENTO COM L-DOPA E EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE OS PREJUÍZOS MOTORES EM CAMUNDONGOS C57BL/6 HEMIPARKINSONIANOS	100
3.12	EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS EM FATIAS	

ESTRIATAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 DISCINÉTICOS.....	101
3.13 O EXERCÍCIO FÍSICO NÃO MODIFICA O CONTEÚDO DE TH EM CAMUNDONGOS C57BL/6 DISCINÉTICOS.....	103
3.14 EFEITO DO TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> COM DOPAMINA SOBRE A PLASTICIDADE EM FATIAS ESTRIATAIS	104
4 DISCUSSÃO	107
5 CONCLUSÃO	117
REFERÊNCIAS	119

LISTA DE PUBLICAÇÕES E RESUMOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DESTA TESE:

Artigos científicos:

AGUIAR, A. S. Jr; SPECK, A. E.; AMARAL, I.; CANAS, P. M.; CUNHA, R. A. . The exercise sex gap and the impact of the estrous cycle on exercise performance in mice. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1-8, 2018.

SPECK, A. E.; AGUIAR, A. S. Jr ; SCHAMNE, M. G. ; CUNHA, R. A. ; PREDIGER, R. D. Treadmill exercise attenuates L-DOPA-induced dyskinesia and increases striatal levels of glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) in mice. **Molecular Neurobiology**, v. 1-2, p. 1-8, 2018.

SAMPAIO T. B.; ROVERSI, K.; SCHAMNE, M. G.; CUNHA S A; FRANCA, A. P.; SPECK, A. E.; DAHER, J. P. L.; WALZ, R.; PREDIGER, R. D. The relevance of intranasal route in Parkinson's disease: from physiopathological alterations to administration of neurotoxins. **Clinical and Translational Science**, v. 1-2, p. 20-37, 2017.

Resumos em congressos:

AGUIAR, A. S. Jr.; SPECK, A. E.; CANAS, P. M.; CUNHA, R. A. The ergogenic effects of caffeine depend on neuronal A_{2A}R. **Purines Congress**, Foz do Iguaçú, 2018.

AGUIAR, A. S. Jr.; SPECK, A. E.; CANAS, P. M.; CUNHA, R. A. The ergogenic effects of caffeine depend on A_{2A} receptors. **Sfn Neuroscience**, San Diego. 2018.

SPECK, A. E.; AGUIAR, A. S. Jr.; CUNHA, R. A.; PREDIGER, R. S. Adenosinergic drugs control striatal metaplasticity in mice with L-DOPA-induced dyskinesia. **Purines Congress**, Foz do Iguaçú, 2018.

SPECK, A. E.; AGUIAR, A. S. Jr.; CUNHA, R. A.; PREDIGER, R. S. Adenosinergic drugs control striatal metaplasticity in mice

with L-DOPA induced dyskinesia. Neuroscience, San Diego, **SfN Neuroscience**, 2018.

SPECK, A. E.; SCHAME, M. G.; FRANCA, A. P.; PREDIGER, R. S.; AGUIAR, A. S. Jr. Characterization of L-DOPA induced dyskinesia in 6-OHDA-hemiparkinsonian Swiss mice. **45^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, Natal, Rio Grande do Norte, 2016.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa que afeta aproximadamente 1% da população acima dos 65 anos (BASTIDE et al., 2015). Sua descrição pioneira foi realizada pelo médico londrino James Parkinson (1755-1824) em sua monografia “*An Essay on the Shaking Palsy*” (Um ensaio sobre a paralisia agitante) (1817), onde descreveu detalhadamente esta condição conhecida atualmente como DP (PARKINSON, 1817, 2002). James Parkinson destacou a descrição de dois sintomas motores da doença: o tremor de repouso que denominou como *paralysis agitans* (paralisia agitante) e a marcha festinante¹. Além disso, Parkinson descreveu outros sintomas como a assimetria, a disartria e quedas frequentes, bem como dificuldades de deglutição, sialorreia e incontinência urinária. Entretanto, com base em suas avaliações clínicas, James Parkinson descreveu que os sentidos e o intelecto destes pacientes estavam intactos. Hoje sabe-se que os pacientes podem apresentar depressão nos estágios iniciais da doença evoluindo para alucinações com o avançar da doença (NEGRE-PAGES et al., 2010).

Aproximadamente um século após a descrição de James Parkinson, o médico francês Jean Martin Charcot (1825-1893), trabalhando no *Hôpital de la Salpêtrière* em Paris, realizou diversas contribuições à descrição da DP, incluindo a renomeação da doença em homenagem a James Parkinson (GOETZ, 1986). Ele também deu continuidade a caracterização dos sinais e sintomas da doença, assim como determinou os principais sinais cardinais característicos da doença: rigidez, bradicinesia e tremor de repouso. Além disso, Charcot realizou a distinção entre a DP e a Esclerose Múltipla, dentre outras patologias caracterizadas pelo tremor (GOETZ, 1986; PARENT; PARENT, 2010). Adicionalmente, Charcot caracterizou sintomas não motores da doença, como a depressão e alucinações, que até o momento não haviam sido descritos (WALUSINSKI, 2018).

¹ Parkinson correlacionou a rigidez muscular durante a deambulação de seus pacientes como se fossem “uma peça de maquinaria” ele disse, falando de sua aparência.

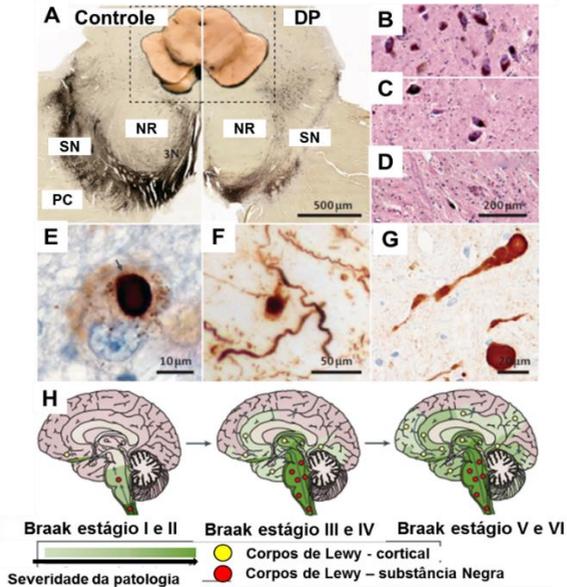
A descoberta da principal região afetada pela DP, a substância negra parte compacta (SNpc), foi realizada acidentalmente por Charcot que observou o Parkinsonismo em um paciente tuberculoso. Os exames *post-mortem* realizados por seus residentes Paul Blocq e Gheorghe Marinescu indicaram um tumor na SN deste paciente (PARENT; PARENT, 2010). Este trabalho pioneiro foi publicado em 1893, e levou Edouard Brissaud a formular a sua hipótese em 1895 de que a SN seria a principal área do sistema nervoso central (SNC) afetada na DP. Anos depois, ele relatou pela primeira vez evidências de que a lesão da SN encontrada nestes pacientes poderia estar relacionada com o tremor parkinsoniano. Este fato só foi confirmado posteriormente por Constantin Trétiakoff em 1919, no laboratório do próprio Marinescu, ao observar a redução do número de células pigmentadas na SN do mesencéfalo. Trétiakoff também observou a presença de inclusões citoplasmáticas nas células da SN, atualmente reconhecidas como marcadores anatomopatológicos da DP (PARENT; PARENT, 2010).

A DP é caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da SN (SNpc), localizada no mesencéfalo (Figura 1). Estes neurônios enviam projeções para o corpo estriado (via dopaminérgica nigroestriatal), formado por dois núcleos da base (caudado e putâmen). A morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc permanece como a principal alteração neuropatológica encontrada nos estudos *post-mortem* em pacientes parkinsonianos, sendo associada ao aparecimento dos sintomas motores da DP (HIRSCH; GRAYBIEL; AGID, 1988). Na SNpc também são encontradas inclusões eosinofílicas citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy (formadas principalmente pelo acúmulo das proteínas α -sinucleína e ubiquitina) utilizadas como marcadores *post-mortem*, sendo estas também encontradas em diferentes regiões corticais dependendo da severidade da patologia (BLANDINI et al., 2000).

A neurobiologia da α -sinucleína é apontada como papel central no estudo da DP desde a descoberta de que mutações nesta proteína possam causar a DP familiar (SPILLANTINI et al., 1997). A descoberta de que a α -sinucleína é um componente importante dos corpos de Lewy na DP idiopática aumentou o interesse na proteína, assim como a observação de que a duplicação ou a triplicação do gene da α -sinucleína também causa a DP

(SINGLETON et al., 2003). A α -sinucleína teve ainda outro impacto importante, quando Braak e colegas publicaram descrições elegantes de padrões anormais de imunomarcagem de α -sinucleína em encéfalos humanos, e propuseram um esquema de estadiamento neuropatológico (estágios de I ao VI) (BRAAK et al., 2003). Eles propuseram que o primeiro estágio da DP (Fase 1) é caracterizado por imunocoloração anormal de α -sinucleína confinada à medula oblonga ou ao bulbo olfatório, e que os sintomas motores encontradas na clínica e a perda de neurônios na SNpc ocorrem tardiamente no curso da doença (BRAAK et al., 2003).

Figura 1 – Degeneração dopaminérgica e formação e distribuição dos corpos de Lewy observados na doença de Parkinson.



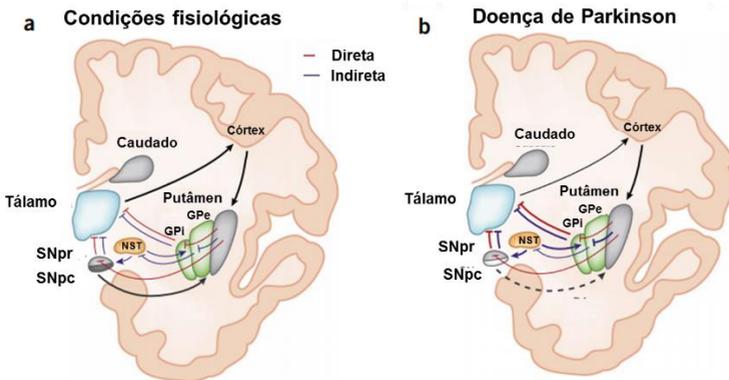
Legenda: As principais alterações neuropatológicas observadas na doença de Parkinson (DP). A DP é caracterizada pela despigmentação da substância negra (SN) (parte direita) comparado com o controle (parte esquerda) (A). Imagens do mesencéfalo após coloração imunohistoquímica para tirosina hidroxilase, enzima limitante na síntese de catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina). A técnica de coloração com hematoxilina e eosina indica uma distribuição normal de neurônios pigmentados em um indivíduo controle saudável (parte B), bem como a perda seletiva de corpos celulares de neurônios da SN em estágios moderados (parte C) ou avançados (parte D) da DP. A marcação com imunohistoquímica da α -sinucleína mostra a presença de Corpos de Lewy (E), depósitos granulares mais difusos de α -sinucleína (F) e esferóides α -sinucleína (G). Segundo a hipótese de Braak sobre a distribuição de agregados de α -sinucleína no encéfalo de pacientes com a DP, as inclusões ocorrem inicialmente em neurônios colinérgicos e monoaminérgicos do tronco encefálico (estágios I e II), seguindo para o mesencéfalo e prosencéfalo basal em pacientes com os sintomas motores (estágios III e IV), e por fim regiões límbicas e o neocórtex (estágios V e VI). Abreviações: DP, doença de Parkinson; NR, núcleo rubro; PC, pedúnculo cerebral; SN, Substância Negra. Fonte: Adaptado de POEWE et al., 2017.

Para uma melhor compreensão da fisiopatologia da DP é necessário o conhecimento da circuitaria dos núcleos da base (NB). Os NB são um conjunto de estruturas cerebrais constituídas pelo corpo estriado: núcleo (caudado e putâmen), globo pálido, núcleo subtalâmico e substância negra (SN). Estas estruturas controlam a atividade motora por meio da regulação de impulsos neuromotores que facilitam sua atividade tônica, auxiliando o planejamento e a execução de movimentos sequenciados como, por exemplo, a marcha humana (GROENEWEGEN, 2003). Movimentos intencionais são em essência iniciados pelo córtex motor cerebral que diretamente, ou indiretamente via circuitos pré-motores locais, atingem o tronco cerebral ou neurônios motores espinhais que projetam para os músculos (GROENEWEGEN, 2003; KREITZER; MALENKA, 2008). Os NB e o cerebelo exercem sua influência sobre as vias de saída do motor final em grande parte através do tálamo na eferência, corticobulbar e vias motoras corticoespinhais que se originam no áreas motoras e pré-motoras do córtex cerebral. Desta forma, tanto os NB como o cerebelo têm um papel essencial e distintivo na organização do movimento motor (coordenação, tempo e sequenciamento) (GROENEWEGEN, 2003).

O tipo neuronal predominante no estriado são os neurônios espinhais médios (NEMs), densamente espinhosos que recebem e integram a maior parte de entradas no corpo estriado provenientes do córtex cerebral e tálamo e que projeta para o globo pálido e a SN (KREITZER; MALENKA, 2008). A via direta permite a ativação do tálamo, levando ao envio de projeções excitatórias ao córtex, facilitando o movimento - esta via é estimulada pela ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D1 (excitatórios) no estriado. Por outro lado, a via indireta inibe as projeções talâmicas excitatórias, inibindo o movimento - esta via é inibida pela ativação de receptores D2 (inibitórios) no estriado, tem um efeito supressor na ação motora. A redução da inervação dopaminérgica proveniente da SNpc no estriado, como ocorre na DP, leva a uma redução da ativação da via direta, bem como a inibição da via indireta, o que provoca uma ativação excessiva do segmento interno do globo pálido (GPi) e parte reticulada da substância negra (SNpr), levando a inibição do tálamo, resultando em déficits motores (Figura 2B) (CALABRESI et al., 2014). Além

disso, pode-se ter a condução de efeitos excitatórios a partir de áreas motoras corticais sem que haja a passagem pelo estriado (via hiperdireta). Através desta via, temos uma excitação breve que envolve uma ativação do núcleo subtalâmico (NST) diretamente pelo córtex, e a posterior inibição do tálamo a partir de projeções do GPi sob estímulo do NST (POEWE et al., 2017).

Figura 2 – Ilustração das alterações da circuitaria dos núcleos da base observadas na doença de Parkinson.



Legenda: Representação esquemática dos núcleos da base em condições fisiológicas (a) e na doença de Parkinson (b). Abreviações: GPi: globo pálido interno; GPe: globo pálido externo; SNpc: parte compacta substância negra; SNpr: substância negra parte reticulada; NST: núcleo subtalâmico. *Fonte:* Adaptado de CALABRESI et al., 2014.

1.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA DP

Em 1936, Otto Loewi e Henry Dale receberam o Prêmio Nobel por sua pesquisa sobre o papel da acetilcolina (ACh) e agentes que afetam o sistema nervoso autônomo, caracterizando a ACh como um neurotransmissor. Esta descoberta, junto aos estudos realizados por Feldberg, proporcionaram o entendimento da eficácia da terapia anticolinérgica na DP. Ordenstein, um dos médicos internos de Charcot escreveu sua tese sobre o tratamento do tremor parkinsoniano com a atropina, o primeiro tratamento farmacológico bem estabelecido da DP (GOETZ, 2011; MARTHE, 1948). Destas observações, surgiu a hipótese de cooperação pós-sináptica entre a ACh (excitatória) e a dopamina

(DA) (inibitória) no estriado (THRELFELL; CRAGG, 2011). Com base nesta informação, indústrias farmacêuticas passaram a produzir antagonistas muscarínicos (agente anticolinérgico que bloqueia a atividade dos receptores muscarínicos para ACh). No entanto, estes fármacos demonstraram baixa eficácia na clínica, além de um grande número de efeitos colaterais (boca seca, visão turva e déficits cognitivos) (CONNOLLY, LANG, 2014).

Neste mesmo período, a terapia com anfetamina foi iniciada, apresentando eficácia moderada frente aos sintomas motores dos pacientes com a DP. Neste momento as anfetaminas foram empregadas combinadas com antagonistas muscarínicos especialmente para o tratamento da bradicinesia (FAHN, 2015b). Outra estratégia farmacológica testada na DP foi o uso da apomorfina (um agonista dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 e D2). Sintetizada em 1869, a apomorfina era até então conhecida pelo seu efeito indutor de estereotípias em animais (BARD, 1964; FAHN, 2015b). Em 1957, o pesquisador sueco Arvid Carlsson mostrou que a L-DOPA poderia aliviar a imobilidade induzida por reserpina em coelhos (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957). Além disso, ele observou que a reserpina diminuía a concentração de DA no cérebro, sendo esta restaurada pelo tratamento com L-DOPA. Na mesma época, ele observou que a DA não era apenas um precursor metabólico da noradrenalina, mas também poderia atuar propriamente como um neurotransmissor (PARENT; PARENT, 2010). Com o surgimento da técnica de fluorescência quantitativa sensível a DA nesta época, foi demonstrando a sua distribuição no cérebro de mamíferos pela primeira vez, sendo o corpo estriado a região encefálica com a maior concentração dessa monoamina (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957). Carlsson então postulou que a DA desempenharia um papel relevante no controle da função motora².

Diante das descobertas de Carlsson, Hornykiewicz, químico austríaco, iniciou as medidas *post-mortem* dos níveis de DA em pacientes com a DP. Ele observou uma redução nos níveis de DA no estriado de pacientes com a DP, diferindo de outras

² Apesar do ceticismo inicial da comunidade científica de que a DA atuava como um neurotransmissor, os estudos pioneiros de Carlsson lhe renderam o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 2000.

patologias. Desta forma, foi publicado pela primeira vez um trabalho relatando os achados anatomopatológicos da doença (EHRINGER; HORNYKIEWICZ, 1960). Hornykiewicz e seus colaboradores administraram L-DOPA pela via intravenosa em pacientes parkinsonianos na tentativa de restaurar os níveis de DA, sendo possível observar uma melhora considerável na acinesia dos pacientes (HORNYKIEWICZ, 1970, 1974, 2010). No ano seguinte, na tentativa de permanência do efeito benéfico, os mesmos pesquisadores iniciaram tratamentos com doses crescentes de L-DOPA (concentrações de 50, 100 e 150 mg), observando benefícios por 3 horas, principalmente sobre a acinesia. No entanto, o tratamento não apresentou eficácia sobre a rigidez postural (BIRKMAYER; HORNYKIEWICZ, 1961; FAHN, 2015b).

No mesmo período, e de forma independente, Andre Barbeau e colaboradores observaram efeitos benéficos da L-DOPA sobre a rigidez de pacientes parkinsonianos em Montreal (BARBEAU, 1969; BERNHEIMER et al., 1973). Birkmayer e Hornykiewicz continuaram a sua colaboração, realizando testes em pacientes ao longo dos anos, incluindo com doses orais de L-DOPA. Em 1964, eles trataram 200 pacientes parkinsonianos com L-DOPA (25 mg), uma ou duas vezes por semana. Entretanto, os resultados obtidos não foram tão significativos quanto os resultados iniciais (BIRKMAYER; HORNYKIEWICZ, 1961; HORNYKIEWICZ, 2010). Apenas 20% dos pacientes tratados apresentaram uma melhora da acinesia, 30% não obtiveram benefícios motores e os outros 50% demonstraram alguma melhora na fala ou postura.

Na década de 1960 ainda permanecia o ceticismo e pessimismo em relação a terapia com L-DOPA ou qualquer novo tratamento para a DP baseado na hipótese dopaminérgica. Em 1965, Roger Duvoisin chegou a afirmar que nenhuma evidência havia sido apresentada de que o efeito da L-DOPA poderia ser específico ou diferente de outra amina (DUVOISIN, 1965). O ceticismo em relação a eficácia da L-DOPA chegou ao fim com a publicação de George Cotzias na renomada revista científica *New England Journal of Medicine* em 1968, iniciando o período de substituição dos anticolinérgicos. Em seu estudo, Cotzias e colaboradores descreveram um novo protocolo de administração no qual aumentavam lentamente as dosagens de L-DOPA,

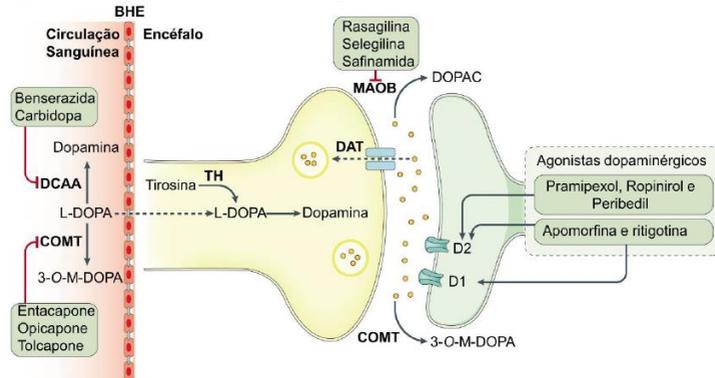
evitando efeitos secundários gastrointestinais, como anorexia, náuseas e vômitos; e ainda obtiveram uma longa duração dos seus benefícios sobre os sintomas motores (COTZIAS, 1968). Este protocolo de aumento gradativo das doses de L-DOPA é utilizado até os dias atuais.

A L-DOPA foi então rapidamente aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1970 (FAHN, 2015a). A eficácia da L-DOPA em reverter os sintomas da DP uniu a importância científica da descoberta da DA no estriado e seu papel fisiológico no controle da função motora, explicando os sintomas motores da DP. Como ilustrado no (Quadro 1), nos anos seguintes outros fármacos foram aprovados para o uso clínico no tratamento sintomático da DP, como a amantadina, um antagonista de receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-Aspartato (NMDA) (FAHN, 2015a; SCHWAB et al., 1969) e estratégias terapêuticas com o objetivo de aumentar o tônus dopaminérgico, como agonistas dos receptores dopaminérgicos, inibidores seletivos da recaptação de DA e inibidores das enzimas de degradação da DA catecol-O-metiltransferase (COMT) e monoamino oxidase B (MAO-B) (HOLLOWAY et al., 2004; RASCOL et al., 2000). Atualmente, embora a L-DOPA continue sendo o “padrão ouro” para o tratamento da DP, a abordagem farmacológica também inclui fármacos que aumentem a transmissão dopaminérgica atuando de forma pré- ou pós-sináptica, como esquematizado na (Figura 3) (POEWE et al., 2017).

Uma das mais importantes considerações a respeito da descarboxilação da L-DOPA pela enzima dopa-decarboxilase é que o primeiro local de sua biotransformação a mucosa gástrica e o intestino delgado, uma etapa fundamental na biodisponibilidade da mesma (RIVERA-CALIMLIM et al., 1970). A metabolização da L-DOPA periférica para DA foi reduzida em 1968, com a introdução da carbidopa, um inibidor periférico da dopadecarboxilase (PAPAVASILIOU et al., 1972). Quando combinada com a L-DOPA, a dose total pode ser reduzida em 75 a 80%. Sabendo-se que o centro medular do vômito não é protegido pela barreira hematoencefálica, um inibidor da dopadecarboxilase periférica (carbidopa ou benserazida) é efetivo em bloquear a metabolização da L-DOPA em DA nesta região, reduzindo os efeitos da conversão como anorexia, náuseas,

vômitos e também diminuir os efeitos colaterais no sistema cardiovascular (CEDARBAUM et al., 1986).

Figura 3 – Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson.



Legenda: O fármaco precursor de dopamina (DA) L-DOPA é administrado em combinação com inibidores periféricos das enzimas descarboxilase de aminoácidos aromáticos (DCAA) e catecol-O-metiltransferase (COMT). Os inibidores da enzima monoamina oxidase B (MAO-B) aumentam a disponibilidade de DA na fenda sináptica. Os agonistas dopaminérgicos atuam através da ativação direta dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 pós-sinápticos. A seta pontilhada da circulação sanguínea para o encéfalo representa o transporte da L-DOPA através da barreira hematoencefálica (BHE). A seta pontilhada através do transportador de dopamina (DAT, do inglês: *dopamine transporter*) demonstra a recaptação de DA na fenda sináptica. 3-OM-DOPA, 3-O-Metil-DOPA; D1, receptor dopaminérgico D1; D2, receptor dopaminérgico D2; DOPAC, ácido 3,4, dioxi-fenilacético; TH, tirosina hidroxilase. *Fonte:* Adaptado de (POEWE et al., 2017)

Quadro 1 – Tratamento farmacológico dos sintomas motores da DP

Classe de medicação	EF	Dosagem	Indicação	Efeitos adversos
IDDP				
Levodopa-carbidopa	1	Dose inicial de 100/25 três vezes ao dia, máx. 1500/375	Todos os sintomas motores	Náusea, hipotensão ortostática, discinesias e alucinações

		mg/d ou mais baseado nos sintomas		
Levodopa-benserazida	1	Dose inicial de 100/25 três vezes ao dia, máx. 1500/375 mg/d ou mais baseado nos sintomas	Todos os sintomas motores	Os mesmos sintomas da Levodopa-carbidopa
Agonistas DA				
Pramipexol	2	Inicia com 0,125 três vezes ao dia máx. de 4,5 mg/dia	Todos os sintomas motores	Náusea, hipotensão, DCI ortostática, edemas, alucinações e sonolência
Ropinol	2	Inicia 2 mg/24h até 16 mg/24h	Todos os sintomas motores	Os mesmos do pramipexol
Ropinol de liberação prolongada	2	6-24 mg ima vez ao dia	Todos os sintomas motores	Os mesmos do pramipexol
Rotigotina	2	Inicia 2 mg/24 h máx. 16 mg/dia	Todos os sintomas motores	Os mesmos do pramipexol
MAOBi				
Selegilina	3	2,5 mg/dia, máx. 5 mg/duas vezes dia	Início dos sintomas e FM	Efeitos estimulantes, dor de cabeça, confusão e aumento dos

				efeitos adversos da L-DOPA
Rasagilina	3	1 mg uma vez ao dia	Início dos sintomas e FM	Dor de cabeça, artralgia, depressão, síndrome de flulike, exacerbação de efeitos adversos da levodopa e constipação
COMTi				
Entacapone	3	200 mg em cada dose de L-DOPA	FM	Urina escura, exacerbação de efeitos adversos da levodopa
Tolcapona	3	100 a 200 mg três vezes ao dia	FM	Urina escura, exacerbação de efeitos adversos da levodopa e hepatotoxicidade
Não específicos				
Amantadina	4	Inicia 100 mg/dia, máx. 4 vezes ao dia	Disfunção de marcha e discinesias	Alucinações, confusão, visão turva, edema no tornozelo, náusea, boca seca e constipação
β-Bloqueador				
Propranolol	5	Inicia 40 mg/dia, máx. 320 mg/dia	Tremor	Fadiga e tontura
Anticolinérgicos				
Triexifenidil	4	Inicia 1 mg/dia; manutenção típica 2 mg três vezes ao dia	Tremor	Alucinações, CI, náusea, boca seca, visão turva, urinária retenção e constipação

Benzatropina	4	Inicia 0,5 a 1 mg uma vez ao dia, manutenção típica 1-2 mg três vezes ao dia	Tremor	Os mesmos sintomas de Triexifenid
Neuroléptico				
Clozapina		Inicia 6,5 a 12,5 mg na hora de deitar, máx. 150 mg/dia	Tremor e discinesias	Agranulocitose, miocardite, convulsões, sedação e hipotensão ortostática

Legenda: IC, comprometimento cognitivo; COMTi, inibidores de catecol-metiltransferase; DCI, distúrbios de controle dos impulsos; MAOBi, inibidores da monoamina oxidase do tipo B; FM, flutuações motoras; IDDP inibidor da dopa descarboxilase periférica. EF Escala de eficácia: 1 (mais eficaz) a 5 (menos eficaz) Fonte: (CONNOLLY; LANG, 2014; DEL-BEL et al., 2015; POEWE et al., 2017).

1.3 DISCINESIAS INDUZIDAS POR L-DOPA (LIDs)

A L-DOPA revolucionou o tratamento da DP, reduzindo a mortalidade e promovendo uma melhora significativa na qualidade de vida dos pacientes parkinsonianos (MAIER HOEHN, 1983). O entusiasmo inicial em torno dos efeitos positivos da L-DOPA deu lugar ao reconhecimento de que a longo prazo essa terapia é acompanhada pelo desenvolvimento de eventos adversos relacionados a flutuações na resposta motora. Estas incluem: flutuações *ON-OFF*, mudanças súbitas e imprevisíveis na mobilidade, e o fenômeno da redução da eficácia clínica da L-DOPA. No entanto, as flutuações motoras mais comuns e debilitantes do tratamento crônico com a L-DOPA são movimentos involuntários e erráticos, conhecidos como as discinesias induzidas por L-DOPA (LIDs) (OLANOW et al., 2004; QUINN, 1998). O desenvolvimento destes movimentos involuntários foi observado desde o uso pioneiro da L-DOPA na

década de 1960, na qual metade dos pacientes apresentavam discinesias após 6 meses de tratamento. Atualmente, estima-se que o uso da L-DOPA a longo prazo provoca LIDs em 40% dos pacientes durante um período de 5 anos; no entanto a porcentagem pode atingir 90% após um período de 10 anos de tratamento (CALABRESI et al., 2010; DEL-BEL et al., 2015; HUOT et al., 2013).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento das discinesias são o início precoce da doença, além da necessidade do uso de altas doses de L-DOPA (Figura 4) (CALABRESI et al., 2010). Esses aumentos na dosagem são decorrentes da desnevarção dopaminérgica progressiva com o passar dos anos, que por sua vez é maior quando o início da doença é precoce (CALABRESI et al., 2014). A terapia com L-DOPA frequentemente é estabelecida quando o tratamento com agonistas dopaminérgicos não tem efeito ou em associação aos agonistas dopaminérgicos. Essa abordagem é utilizada a fim de prevenir ou retardar complicações motoras, como flutuações e discinesias. Esse tema controverso tem sido amplamente debatido há décadas, e a visão predominante atualmente é que o início do tratamento com L-DOPA não deva ser adiado, sendo iniciado logo após o seu diagnóstico (THANVI; LO; ROBINSON, 2007).

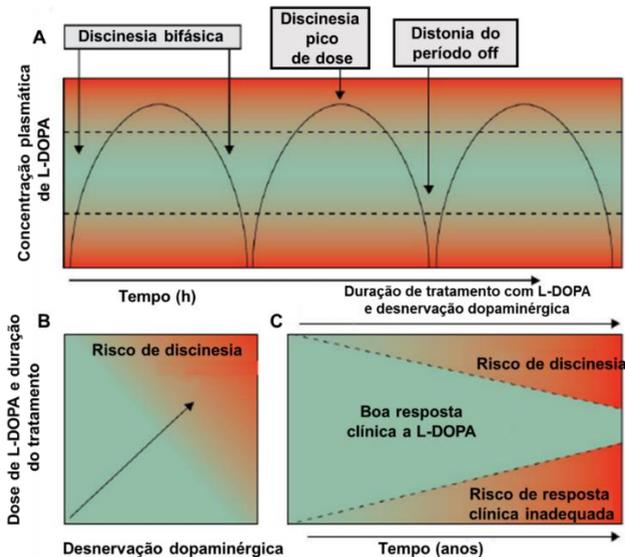
As LIDs podem ser classificadas clinicamente em relação ao tempo de ação da L-DOPA referente as suas concentrações plasmáticas em: i) discinesia de pico de dose; ii) discinesia bifásica; e iii) distonia durante o período *OFF* (CALABRESI et al., 2010) (Figura 3). As discinesias de pico de dose representam movimentos involuntários que coincidem com o pico plasmático da L-DOPA e se iniciam de 30-45 minutos após a administração oral da L-DOPA (CALABRESI et al., 2010). Quando as concentrações encefálicas de DA se elevam ao máximo e o paciente experimenta melhora do seu estado motor, os movimentos discinéticos surgem e persistem durante o período mais eficaz da droga. Com a redução da concentração encefálica de DA, as discinesias reduzem, durando cerca de 30 a 60 minutos e depois desaparecem. Em resumo, apenas uma parte do período *ON* da terapia com L-DOPA é afetada pelas discinesias de pico de dose. Sendo assim, o paciente vivencia diariamente apenas dois estados: *ON* com discinesias e o estado *OFF*, uma situação muito incapacitante (FAHN, 2000). Os tipos de movimentos observados

com maior frequência nas discinesias são a coreia e a distonia seguida pelo balismo em menor frequência.

A coreia³ é caracterizada por contrações involuntárias, irregulares, sem propósito, movimentos não-rítmicos, abruptos e rápidos que parecem fluir de uma parte do corpo para a outra, são as formas mais comuns de LIDs (FAHN, 2000). Esses movimentos são mais comumente associados com a discinesia de pico de dose. A coreia geralmente se manifesta inicialmente num dos hemisférios do corpo que é primeiramente afetado pela doença. A gravidade de movimentos coreicos varia de menor (movimentos involuntários que podem não ser reconhecidos por pacientes) para os maiores e principais (movimentos involuntários que interferem com as atividades da vida diária). Pescoço e membros são mais comumente afetados (CALABRESI et al., 2010; DEL-BEL et al., 2015).

³ A coreia (literalmente “uma dança”) era muito rara antes do advento da L-DOPA, sendo encontrada normalmente apenas nos casos de coreia de Huntington e da coreia que pode ocorrer junto a febre reumática. Hoje ela é bastante comum, pois praticamente todos os pacientes parkinsonianos tratados com L-DOPA a desenvolvem mais cedo ou mais tarde. É muito dramática a observação da flutuação dos pacientes parkinsonianos tratados com L-DOPA entre os dois quadros: a intensa tensão e rigidez parkinsoniana transformando-se na maleabilidade e agitação da coreia (Sacks, 1990).

Figura 4 - Subdivisões clínicas das discinesias induzidas por L-DOPA.



Legenda: O fenômeno clínico das discinesias. Diferentes tipos de discinesias classificadas de acordo com o momento de surgimento dos movimentos anormais (bifásica, pico de dose, distonia do período *OFF*) (A). O risco de surgimento das discinesias depende da degeneração nigroestriatal e da exposição crônica à L-DOPA (B). Redução da janela terapêutica da L-DOPA ao longo do tempo, aumentando o risco de baixa eficácia clínica e de surgimento das LIDs (C). Fonte: Adaptado de (CALABRESI et al., 2010).

A distonia é a segunda forma mais comum de LID, sendo caracterizada por contrações sustentadas de músculos agonistas e antagonistas que podem envolver grupos musculares segmentares/focais. A distonia como parte da LID pode ser observada na discinesia de pico de dose, na distonia bifásica ou distonia de período *OFF*. A distonia bifásica geralmente se apresenta como movimento de semelhante a um chute em um dos membros inferiores geralmente no período que o paciente está dormindo. A distonia de período *OFF* é mais comumente observada no início da manhã, sendo acompanhada de dores nos pés ou dedos dos pés (BASTIDE et al., 2015). Já o balismo caracteriza-se por movimentos com grande amplitude, podendo ser unilaterais ou bilaterais. Os movimentos balísticos são geralmente

parte de uma coreoatetose severa ao invés de serem isolados (BASTIDE et al., 2015).

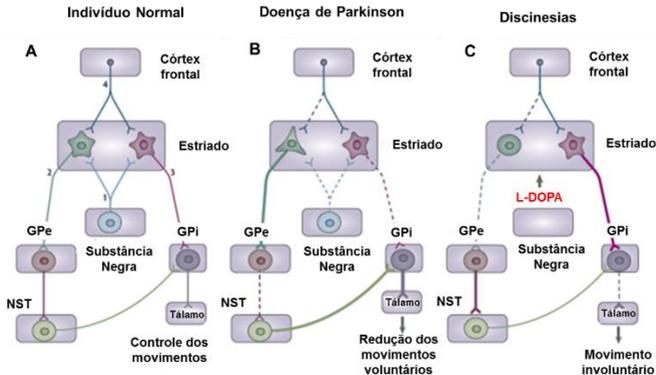
1.4 MECANISMOS DAS LIDs

A ação discinética anormal da L-DOPA pode ser indicativo de efeitos neuronais plásticos ocorrendo tanto em níveis pré-sinápticos quanto pós-sinápticos. Os mecanismos propostos para o desenvolvimento das LIDs são complexos, envolvendo diversos sistemas de neurotransmissão, como a hiperatividade da neurotransmissão glutamatérgica, opioide, adrenérgica e serotoninérgica no estriado (CARTA et al., 2007). Como descrito anteriormente, a disfunção dos circuitos dos NB tem sido relacionada com fisiopatologia da DP. A super-estimulação dopaminérgica dos pacientes tratados com L-DOPA também causa um desequilíbrio do circuito tálamo-córtico-estriatal. Nos NB, a L-DOPA induz discinesia pelo excesso de DA e por inibição excessiva dos neurônios de projeção dos neurônios da SN para GPe (que apresentam receptores do tipo D2, inibitórios) como resultado causa uma desinibição do GPe. Esta desinibição se conecta aos neurônios gabaérgicos (neurônios inibitórios) que se projetam para o NST causando uma hipoatividade deste núcleo. Consequentemente, as projeções glutamatérgicas (excitatórias) provenientes deste núcleo reduzem a ativação dos neurônios de saída GPi/SN. Como resultado, estes desequilíbrios causam uma redução da inibição de neurônios corticais e talâmicos resultando em movimentos involuntários (CARTA; BEZARD, 2011) (Figura 5 C).

Estudos que utilizam tecidos post-mortem de pacientes com DP e tecidos de modelos experimentais de LIDs indicam que e neuromoduladores da via direta e indiretas estão alterados durante a expressão LIDs; estas descobertas têm sido usadas para propor novos alvos de drogas (JENNER, 2008). Eles fornecem alguns *insights* sobre os eventos que levam a indução de discinesias. O uso de modelos animais de LIDs mostram que através da ativação de receptores D1, desencadeia profundas alterações na atividade de três marcadores moleculares para LIDs: Δ FosB, DARPP-32 e ERK1 e ERK2. Essas modificações bioquímicas são desencadeadas pela ativação da proteína quinase A (PKA), após ativação do receptor D1, o fato é notável a redução

das LIDs quando é feita a inibição de PKA. A estimulação induzida por levodopa de receptores D1 também ativa alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) implicado em várias formas de plasticidade sináptica. (KLANN, 2009; CALABRESI et al, 2010).

Figura 5 - Circuitos neuronais dos núcleos da base afetados na DP e nas LIDs.



Legenda: Aferências dopaminérgicas da via nigrostriatal (1) sinapses para neurônios do estriado que compõem as vias indiretas e diretas de saída gabaérgica (ácido g-aminobutírico). A via indireta (2) apresenta predomínio de receptores dopaminérgicos D2 inibitórios em seus corpos celulares, enquanto a via de saída direta (3) apresenta predomínio de receptores dopaminérgicos D1 excitatórios em sua superfície. A via de saída indireta se projeta para o globo pálido externo (GPe), onde se conecta aos neurônios gabaérgicos que se projetam para o núcleo subtalâmico (NST). Os neurônios glutamatérgicos do NST se dirigem para o globo pálido interno (GPi), onde fazem a sinapse para a saída gabaérgica para o tálamo. A projeção da via direta para o GPi, onde também se conecta à saída gabaérgica para o tálamo. Outra aferência importante para o estriado vem do córtex frontal (4) (A). A degeneração das aferências dopaminérgicas da substância negra parte compacta (SNpc) levam à hiperatividade da via indireta e diminuição de atividade da via direta. O número de espinhas dendríticas nos neurônios espinhosos médios no estriado é reduzido. As aferências glutamatérgicas cortico-estriatais também é alterada (B). A administração da L-DOPA (1-3,4-dihidroxifenilalanina) e consequente aumento na produção de dopamina induz alterações na direção oposta, com redução da atividade da via indireta e hiperatividade da via direta (C). *Fonte:* Adaptado de JENNER, 2008.

1.5 MODIFICAÇÕES DA PLASTICIDADE ESTRIATAL CAUSADAS PELAS LIDS

O estriado participa dos processos de aprendizado motor e o estabelecimento de padrões de movimentos habituais (memória de procedimentos). A formação e a execução de movimentos habituais parecem envolver diferentes áreas do estriado. Durante os estágios iniciais do aprendizado de procedimentos o estriado ventral e o núcleo caudado parecem ser os locais primários da atividade, enquanto os estágios finais do aprendizado e da execução dos movimentos aprendidos, o estriado dorsolateral está mais ativado (GRAYBIEL, 2008; THORN et al., 2010). Registros celulares *in-vivo* têm demonstrado que os neurônios de projeção estriatais alteram sua atividade no processo de aprendizado. Estes experimentos revelam que os neurônios estriatais dorsolaterais sistematicamente codificam informações motoras através de um balanço de controle de plasticidade neuronal entre as vias direta e indireta (MARKOWITZ et al., 2018).

Como a atividade dos NEMs do estriado é quase que inteiramente dirigida por suas aferências corticais e talâmicas excitatórias, tais alterações podem refletir mudanças nessas aferências ao estriado ou na força das sinapses córtico-estriatais ou talamoestriatais por modificações na eficiência da transmissão sináptica sob forma de: (i) a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*) e a (ii) depressão de longa duração (LTD, do inglês *long-term depression*), as duas formas quando se utiliza uma estimulação tetânica de alta frequência (HFS, do inglês *high frequency stimulation*); (iii) a despotenciação, quando após um estímulo tetânico de HFS, é aplicado um estímulo tetânico de baixa frequência, (LFS, do inglês *low frequency stimulation*) (CALABRESI et al., 1992, 2007; PICCONI et al., 2003).

Nas sinapses córtico-estriatais dorsolaterais, responsável pela memória dos movimentos aprendidos, a estimulação dos neurônios espinhais médios (MSNs) pode induzir LTD ou LTP, dependendo do nível de despolarização da membrana, o subtipo de receptores dopaminérgicos e de glutamato ativados (CALABRESI et al., 1992a, 1992c; LOVINGER; TYLER; MERRITT, 1993) e os subtipos interneuronais envolvidos na indução do processo

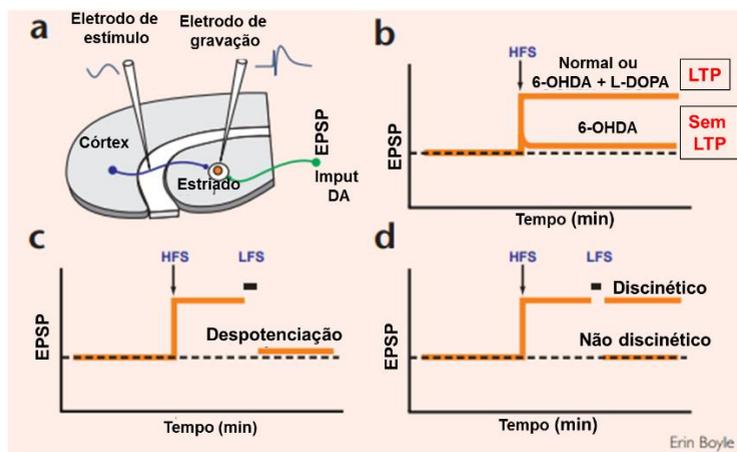
(CALABRESI et al., 2007). Uma característica importante dos neurônios do estriado é que a DA regula tanto a indução quanto a manutenção da neuroplasticidade através da ativação dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 e D2. Em resumo, a DA atuando em receptores D1 coopera para a indução de LTP, enquanto a ativação de ambos os receptores D1 e D2 é necessária para a LTD, sendo esta última, a plasticidade córtico-estriatal dorsolateral presente em animais *naive* (CALABRESI et al., 1992b; CALABRESI; CENTONZE; BERNARDI, 2000; PICCONI et al., 2003). De tal forma, a plasticidade sináptica da SN em pacientes discinéticos, mostra um aumento na amplitude de LTP após administração de L-DOPA, assim como encontrado em modelos animais (PRESCOTT et al., 2009).

Tem sido observado em modelos animais da DP que induzem uma grande perda (acima de 90%) dos terminais dopaminérgicos no estriado, como observado em estágios avançados da DP, a perda de ambas as formas de plasticidade córtico-estriatais, LTD e LTP (PICCONI et al., 2003), a alteração de espinhas dendríticas estriatais (ANGLADE et al., 1996; DAY et al., 2006) e alterações da sinalização glutamatérgica (BETARBET et al., 2004; PICCONI et al., 2004). Modificações dos receptores tipo NMDA nos neurônios pós-sinápticos ocorrem como consequência de um acoplamento alterado entre subunidades do próprio receptor e de seus elementos de interação (GARDONI et al., 2006). Todos estes processos foram identificados como mecanismos críticos subjacentes a expressão de sintomas motores após desnervação dopaminérgica no estriado. Neste, a integridade do sistema dopaminérgico nigrostriatal é de grande importância para a indução de alterações sinápticas como a LTP e a LTD (CALABRESI et al., 1992c; CALABRESI; CENTONZE; BERNARDI, 2000; CENTONZE et al., 1999; PICCONI et al., 2003; XIAO et al., 2017).

De maneira interessante, uma menor desnervação dopaminérgica (aproximadamente 80% de lesão) não afeta a plasticidade na forma de LTD (PAILLE et al., 2010) que é, no entanto, abolida quando a lesão dopaminérgica é completa (PICCONI et al., 2003). Este fato indica que um nível baixo, embora crítico, de DA é necessário para esta forma de plasticidade sináptica. O tratamento crônico com L-DOPA, em uma dosagem terapêutica similar àquela usada em pacientes com a DP, promove

a LTP em animais discinéticos e não discinéticos, o que é conhecido como **metaplasticidade sináptica** decorrente de uso de alguns medicamentos (ABRAHAM; BEAR, 1996; PICCONI et al., 2003). Entretanto, animais que não desenvolvem discinesias mostram uma reversão da plasticidade sináptica estriatal após o protocolo de LFS, enquanto os animais discinéticos não mostraram capacidade de despotenciação (DUNNETT, 2003; PICCONI et al., 2003) (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática dos processos de plasticidade sináptica estriatal de LTD e LTP.

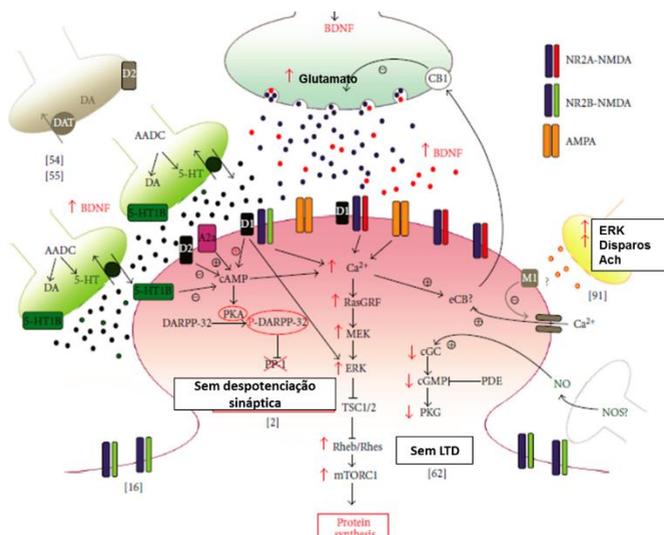


Legenda: Esquematização do posicionamento dos eletrodos de estímulo e de registro em fatia estriatal em corte coronal (A). Estimulação de alta frequência (HFS, do inglês *high frequency stimulation*) aumenta a amplitude do potencial excitatório pós-sináptico (EPSP, do inglês *excitatory postsynaptic potential*) e induz LTP em condições normais córtico-estriatais ou em fatias de animais lesionados com 6-OHDA e tratados com L-DOPA, já em fatias cortico-estriatais de animais lesionados com 6-OHDA (sem tratamento com L-DOPA) não apresentam LTP em resposta ao HFS (B). O protocolo de estimulação de baixa frequência (LFS, do inglês *low frequency stimulation*) reverte a resposta sináptica para os níveis basais, um fenômeno chamado despotenciação (C). O protocolo de LFS, após o protocolo de HFS causa uma despotenciação em fatias cortico-estriatais de animais que não desenvolvem discinesias, o que não é observado nos animais discinéticos (Adaptado de (DUNNETT, 2003).

Resumidamente, a perda da possibilidade de despoteñiação após o protocolo de LFS observado em animais e pacientes discinéticos é atribuída a alterações específicas que ocorrem ao longo da via de sinalização do receptor dopaminérgico D1, levando a níveis anormalmente altos de DARPP-32 (GHIGLIERI et al., 2012; JENNER, 2008). A ativação dos receptores de glutamato do tipo NMDA que estão progressivamente desregulados, causando a perda de controle das cascatas de fosforilação resultando em substratos fosforilados no estriado, assim como subunidades dos receptores NMDA (CHASE; OH, 2000; DUNAH et al., 2000), e AMPA (SANTINI et al., 2007) e cinases reguladas por sinal extracelular (ERK) 1/2 (PAVÓN et al., 2006; SANTINI et al., 2007; WESTIN et al., 2007). O gatilho de todo esse processo que tem sido extensivamente investigado é a sinalização ativada pela estimulação do receptor dopaminérgico do tipo D1 (FEYDER; BONITO-OLIVA; FISONE, 2011).

Além disso, a estimulação dos receptores D1 sensibilizados, provoca hiperativação de PKA e aumento da fosforilação estriatal de DARPP-32 no resíduo de treonina-34 (PICCONI et al., 2011; SANTINI et al., 2007). Esta proteína desempenha um papel fundamental nas alterações sinápticas causadas por estimulação não fisiológica de receptores dopaminérgicos D1. Neste sentido, a DARPP-32 é um potente inibidor da atividade de PP-1, que por sua vez é necessária para despoteñiar a sinapse, e fazer com que a plasticidade retorne aos valores basais (GHIGLIERI et al., 2012; WANG; ZHANG, 2016) (Figura 7).

Figura 7 – Alterações na plasticidade estriatal que levam ao desenvolvimento das discinesias induzidas por L-DOPA em modelos animais.



Legenda: Excesso de dopamina estriatal causada pela administração de L-DOPA estimula os receptores D1 para dopamina com a consequente hiperfosforilação de cinases reguladas por sinal (ERK) e ativação exacerbada de proteína quinase A (PKA) que levam a hiperfosforilação de DARPP32, que bloqueia a proteína fosfatase 1 (PP-1), causando prejuízos na despotação sináptica. A liberação de glutamato é regulada pelos endocanabinoides (eCB) ativada pelo aumento das concentrações intracelulares de cálcio (Ca²⁺) pelos receptores muscarínicos M1. Hiperativação de ERK causam desinibição de Rheb / Rhes (proteína de ligação GTP), levando ao aumento excessivo de sinalização de mTORC1 (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) que, por sua vez, exerce seus efeitos a longo prazo através de mudanças na síntese de proteínas. Após o tratamento crônico com L-DOPA, ocorre um aumento -ERK nos interneurônios colinérgicos, aumento das taxas de disparo destes neurônios com o consequente aumento da liberação de acetilcolina (Ach). A sinalização para a LTD, que depende estritamente da ativação da proteína quinase G (PKG) dependente de óxido nítrico (NO-) está ausente nas LIDs. Adaptado de: Ghiglieri; et al (2012).

1.6 TRATAMENTO DAS LIDs

Atualmente, o único fármaco antidiscinético aprovado pela FDA para uso clínico é a amantadina (PEREZ-LLORET; RASCOL, 2018). Introduzida inicialmente como um antiviral contra o vírus influenza A, descobriu-se em 1968 que a amantadina apresentava efeitos antiparkinsonianos ⁴através do antagonismo dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, inibição da recaptação de DA e aumento da liberação de DA (SCHWAB et al., 1969). Entretanto, esta apresentou eficácia terapêutica limitada como monoterapia na DP. Por outro lado, a amantadina apresentou em um efeito significativo na redução de 30 a 50% das LIDs em pacientes com a DP (ORY-MAGNE et al., 2014; SNOW et al., 2000). Alguns estudos reportam efeitos colaterais importantes para a amantadina, como: constipação, disfunção cardiovascular, sintomas neuropsiquiátricos como: alucinações, perda da libido, sedação e mioclonias (FOX et al., 2011; PEREZ-LLORET; RASCOL, 2018; VIJVERMAN; FOX, 2014).

Novas formulações de amantadina têm sido desenvolvidas, como a ADS-5102, que apresenta uma absorção lenta e ao ser administrada a noite apresenta uma concentração plasmática máxima no início da manhã quando a indução das LIDs é maior (ISAACSON et al., 2018). A ADS-5102 (amantadina) são capsulas de liberação prolongada do medicamento, que foram projetadas para fornecer um perfil de tempo-concentração distinta da amantadina tradicional que é de liberação imediata. Ela reduz significativamente a Escala Unificada de Avaliação para a Doença de Parkinson do (inglês UPDRS, *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*) (PALMER et al., 2010) (indicativo da melhora dos sintomas motores na DP), todavia, com os mesmos efeitos colaterais descritos anteriormente (LOTIA; JANKOVIC, 2016). O Quadro 2 apresenta um sumário dos fármacos disponíveis

⁴ Em abril de 1968, uma mulher de 58 anos de idade portadora da DP relatou que três meses antes, enquanto utilizou cloridrato de amantadina (100 mg duas vezes ao dia) para prevenir a gripe, ela experimentou uma notável remissão de seus sintomas de rigidez, tremor e acinesia. Estes sintomas retornaram após seis semanas da interrupção do tratamento com amantadina.

atualmente e os que estão em estudos clínicos para o tratamento das LIDs.

Quadro 2– Sumário dos fármacos em estudos clínicos para o tratamento das discinesias induzidas por L-DOPA.

Classe Farmacológica	Droga	Achados Clínicos	Referências
Antagonistas do receptor NMDA para glutamato	Amantadina	Efetiva contra LIDs, controvérsia sobre a duração do efeito antidiscinético, completou com sucesso a fase clínica III	(LUGINGER et al., 2000)
	Dextrometorfano	Reduziu as discinesias em 30-40%	(AHLKOG; MUENTER, 2001)
	Remacemide	Nenhum efeito antidiscinético	(AHLKOG; MUENTER, 2001)
	Memantine	Possivelmente eficaz contra LIDs, boa tolerabilidade e segurança	(ABERCRO MBIE; BONATZ; ZIGMOND, 1990)
	Neu-120	Atualmente na fase II. Boa segurança e tolerabilidade	(DEL-BEL et al., 2014)
Antagonistas do receptor AMPA para glutamato	Perampanel	Nenhum efeito antidiscinético	(EGGERT et al., 2010)
	Talampanel	Nenhum resultado descrito até o momento	(BARGIOTA S; KONITSIOTI S, 2013)
Antagonistas dos receptores metabotrópicos (mGluR) para glutamato	AFQ056	Reduziu as LIDs sem influenciar os sintomas parkinsonianos	(BERG et al., 2011; STOCCHI et al., 2013)

	Dipraglurante (ADX-48,621)	Melhorou as LIDs e os sintomas parkinsonianos	(AHLKOG; MUEENTER, 2001)
Antagonistas do receptor alfa2-adrenérgico	Idazoxan	Resultados controversos relativos à eficácia e efeitos adversos	(MANSON; IAKOVIDO U; LEES, 2000; RASCOL et al., 2001)
	Fipamezole	Parcialmente eficaz contra as LIDs	(LEWITT et al., 2012)
Antagonistas do receptor A2A para adenosina	Preladenant (Sch 420814)	Melhorou as LIDs e os sintomas parkinsonianos	(HAUSER et al., 2011)
	Istradefilina	Melhorou as LIDs e os sintomas parkinsonianos	(MIZUNO et al., 2010)
	Tozadenante (SYN115)	Nenhum efeito na discinesia, melhora nos sintomas parkinsonianos	(MIZUNO et al., 2010)
Agonistas de receptores nicotínicos	Nicotina	Efeitos antidiscinéticos com efeitos adversos graves	(AHLKOG; MUEENTER, 2001)
	SIB-1508Y	Baixa tolerabilidade	(AHLKOG; MUEENTER, 2001)
	AQW051	Nenhum efeito antidiscinético	(TRENKWA LDER et al., 2016)
Inibidores da monoamina oxidase-B	Selegilina	Resultados controversos sobre a eficácia contra LIDs	(LEES, 1995)

	Rasagilina	Parcialmente eficaz contra LIDs	(RASCOL et al., 2005)
	Safinamida	Melhorou as LIDs	(BORGOHAIN et al., 2014)
Agonistas parcial do receptor para dopamina	Aripiprazol	Eficaz contra LIDs, bem tolerado	(MECO et al., 2009)
	Pardoprunox	Eficaz contra LIDs, melhorou os sintomas parkinsonianos	(HAUSER et al., 2009)
	Aplindore	Nenhuma descoberta disponível	(AHLKOG; MUENTER, 2001)
Agonistas serotoninérgicos	Tandospirona	Nenhum efeito nas LIDs, piorou os sintomas parkinsonianos	(AHLKOG; MUENTER, 2001)
	Sarizotano	Resultados controversos sobre a eficácia contra LIDs	(AHLKOG; MUENTER, 2001)
	Piclozotano	Nenhuma descoberta disponível	(AHLKOG; MUENTER, 2001; BARGIOTAS; KONITSIOTIS, 2013)
Outros tratamentos	Zonisamida	Eficácia dependente de dose contra LIDs	(AHLKOG; MUENTER, 2001)
	Gabapentina	Nenhum efeito na discinesia	(AHLKOG; MUENTER, 2001)
	Topiramato	Nenhum resultado descrito até o momento	(AHLKOG; MUENTER, 2001; BARGIOTA

		S; KONITSIOTI S, 2013)
Valproato	Nenhum efeito na discinesia	(BARGIOTA S; KONITSIOTI S, 2013)
Levetiracetam	Efeitos antidiscinéticos leves	(BARGIOTA S; KONITSIOTI S, 2013)

Legenda: LIDs: discinesia induzida por L-DOPA; NMDA: N-metil-D-aspartato; mGluR: AMPA: receptor α - amino - 3 - hidróxi - 5 - metil - 4 - isoxazolepropiónico ácido; receptores metabotrópicos para o glutamato HT serotoninérgicos, Receptores. Para mais informações, consulte (DEL-BEL et al., 2015; POEWE et al., 2017).

No entanto, outras terapias não farmacológicas estão sendo empregadas para o tratamento das LIDs. Como por exemplo, a estimulação magnética transcraniana (EMT), é um método seguro e não invasivo que estimula o córtex cerebral, no entanto, não estimula as estruturas profundas (PASCUAL-LEONE et al., 1994). Estudos prévios utilizaram a EMT para reduzir prejuízo motor na DP. A EMT em frequências de 5 Hz ou superior pode aumentar a excitabilidade do córtex motor, enquanto as frequências mais baixas de EMT (1 Hz ou inferior) podem diminuir transitariamente a excitabilidade cortical (PASCUAL-LEONE et al., 1994). Com isso pode-se prevenir o aumento da dosagem de L-DOPA nestes pacientes e, conseqüentemente, possa ocorrer uma redução nas LIDs.

Uma terapia não farmacológica utilizada menos frequentemente é a estimulação encefálica profunda, o DBS (do inglês, *deep brain stimulation*), um tratamento cirúrgico eficaz para os sintomas motores da DP após a perda da eficácia clínica da L-DOPA e outros fármacos anti-parkinsonianos (WILLIAMS; OKUN, 2013). O procedimento do DBS consiste na inserção de um microeletrodo, por meio de uma cirurgia estereotáxica, em uma das estruturas cerebrais dos núcleos da base (como por exemplo o NST, ou GPi) (TERZIC; ABOSCH, 2012). Os parâmetros de estimulação do microeletrodo são controlados através de telemetria por um estimulador implantado subcutaneamente na

região torácica do paciente. No entanto, a DBS é uma técnica dispendiosa, que requer uma avaliação criteriosa de uma equipe altamente especializada para a seleção dos pacientes.

A técnica é bem estabelecida para os sintomas da DP, utilizada para diminuir as complicações do tratamento farmacológico (HARIZ; HARIZ, 2013). Uma meta-análise recente mostrou que o uso de DBS tanto no NST como no GPi podem reduzir os tremores dos pacientes sem diferenças significativas entre os dois alvos de estimulação (WONG et al., 2018). Os benefícios desta cirurgia são substanciais na escala UPDRS na parte motora, com consequente redução na gravidade das LIDs (WILLIAMS et al., 2010). No entanto, pacientes submetidos a DBS podem desenvolver eventos adversos importantes, como compulsões por sexo e jogos de azar (WILLIAMS et al., 2010).

1.7 O POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA DOENÇA DE PARKINSON E NAS LIDs

1.7.1 Exercício físico em pacientes com a DP

Desde o início de 1970, a L-DOPA tornou-se amplamente disponível e muitos acreditavam que era a cura para a DP. Isso levou a uma redução no interesse em tratamentos complementares, como a fisioterapia e o exercício físico. Dentro de poucos anos, entretanto, tornou-se evidente a redução da eficácia clínica e o aparecimento das LIDs após o tratamento crônico com a L-DOPA (AMBANI; VAN WOERT, 1973; MOSKOVITZ; MOSES; KLAWANS, 1978). Como consequência, tem havido um renovado interesse para opções de tratamentos não farmacológicos adjuvantes para o tratamento medicamentoso. Desta forma, vários trabalhos têm empregado o exercício físico como adjuvante no tratamento da DP, desde clínicas e centros de reabilitação assim como intervenções experimentais em centros de pesquisa e de laboratórios utilizando modelos animais da DP. Hoje em dia, além do regime farmacológico padrão, a fisioterapia é frequentemente prescrita isoladamente ou associada com outras opções não farmacológicas de tratamento, tais como a terapia ocupacional e a fonoaudiologia (AGUIAR, PREDIGER, 2012). Além disso, vários

estudos têm indicado o potencial do exercício físico como uma estratégia de neuroproteção na DP.

Diversos estudos clínicos também têm abordado os possíveis efeitos neuroprotetores do exercício físico na DP. Um estudo de metanálise indicou que os indivíduos que eram consistentemente ativos durante toda a vida ou ativos em pelo menos um dos períodos de idade apresentavam um menor risco de desenvolver a DP em comparação com aqueles indivíduos que possuíam baixos níveis de atividade física ao longo da vida (MAVROMMATI et al., 2017). Por exemplo, um trabalho prospectivo mostrou que pessoas que se mantiveram fisicamente ativas no início da fase adulta tiveram menores índices de desenvolvimento de DP (CHEN et al., 2005). Isto sugere que a prática do exercício físico pode representar um fator de proteção contra o desenvolvimento da DP. (CHEN et al., 2005; GRAZINA; MASSANO, 2013; MAVROMMATI et al., 2017; TOMLINSON et al., 2012).

O exercício físico induz mudanças alostéricas a níveis central e periférico, levando a um suporte neurotrófico, aumentando a formação de sinapse e de novos neurônios e diminuindo o processo de estresse oxidativo em pessoas idosas (COTMAN; BERCHTOLD, 2002). Uma grande variedade de profissionais de saúde - fisioterapeutas, terapeutas ocupacionais, gerontologistas, neurologistas, psicólogos e outros - podem estar envolvidos na reabilitação de pacientes com a DP. Muitas vezes a fisioterapia centra-se nas deficiências (por exemplo, sintomas neurológicos), limitações funcionais (por exemplo: caminhar, subir escadas, o ato de alcançar, o de agarrar) e as deficiências (por exemplo: atividades de lazer, esporte e atividades sociais) e é composta por exercícios de mobilidade, formação e manutenção da marcha (com e sem a aplicação de estímulos externos), a formação de atividades diárias, terapia de relaxamento e exercícios de respiração, entre outros (DE GOEDE et al., 2001). Outro objetivo é educar o indivíduo (bem como a família e cuidadores) sobre o processo da doença e os benefícios da fisioterapia (DE GOEDE et al., 2001).

A fisioterapia pode servir como um importante complemento para os regimes de tratamento farmacológico e neurocirúrgico disponíveis em relação a sintomas neurológicos (por exemplo, tremor, bradicinesia e rigidez), a capacidade de

andar, atividades de vida diária e qualidade de vida (DE GOEDE et al., 2001; PALMER et al., 1986). Deve ser notado, no entanto, que a fisioterapia é focada principalmente em estratégias de mobilidade, em vez de os sintomas neurológicos, tais como rigidez e tremor. Desta maneira, existem diversos estudos que avaliam os efeitos de intervenção de fisioterapia em associação ao tratamento farmacológico antiparkinsoniano, que parece ser uma abordagem interessante para os problemas de mobilidade que acompanham os sintomas motores da doença. Eles estão resumidos na Tabela 1. Em geral, a abordagem paliativa é o principal objetivo da fisioterapia assim como maximizar a capacidade funcional e minimizar as complicações secundárias através da reabilitação do movimento dentro de um contexto de educação e apoio para a pessoa como um todo.

Tabela 1: Efeitos do exercício físico em pacientes com a DP.

Intervenção	Resultados Significativos	Referência
Realidade Virtual	↓ risco de quedas	(MIRELMAN et al., 2016)
Thai Chi Chuan	sem modificações motoras	(AMANO et al., 2013)
Treinamento muscular	↑RM, ↑ massa corporal gorda ↑ aumento da densidade mineral óssea	(HASS; COLLINS; JUNCOS, 2007; PALMER et al., 1986)
Treino de baixa resistência e treinamento de equilíbrio	↑ equilíbrio	(PANG; MAK, 2009; TOOLE et al., 2000)
Fisioterapia	↓ escore UPDRS	(DIXON et al., 2007; MARCHESE et al., 2000)
Esteira e bicicleta	↑ VO ₂ max e ↑ a iniciação do movimento	(BERGEN et al., 2002)
Exercício melhora resistência, equilíbrio,	↓ escore UPDRS	(COMELLA et al., 1994)

marcha e motricidade fina		
Exercício melhora rotação de tronco, tempo de deitado para sentado, rotação em 360°, teste da caminhada de 6 minutos e 10 minutos	↑ função da rotação de tronco, ↓ tempo de retorno em 360° e	(SCHENKMAN et al., 1998)
Velocidade da marcha, cadência do passo	↑ velocidade da marcha, cadência t	(MIRELMAN et al., 2011; PROTAS et al., 2005; STUDER et al., 2017)
SPPC	↑ da marcha	(MIYAI et al., 2000, 2002)
Programa de treinamento envolvendo treinamento de sentando para levantando e atividades na cama	↑ virar na cama, ↑ levantar da cadeira, ↓ das quedas	(ALLEN et al., 2010; NIEUWBOER et al., 2001)
Exercício aeróbico	↓ mortalidade	(THAUT et al., 1996)

Legenda: Abreviações: ↑: melhoria; ↓: diminuição; SPPC: suporte parcial de peso corporal; UPDRS: Escala Unificada de Avaliação para a Doença de Parkinson; RM: contração muscular máxima.

1.7.2 Exercício físico em modelos animais da DP

Evidências crescentes mostram que o exercício físico moderado desempenha um papel importante na melhora do déficit motor e cognitivo verificados em um modelo experimental da DP. Por exemplo, os ratos não exercitados exibem diminuição dependente da idade da vascularização e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF, do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*) (VILLAR-CHEDA et al., 2009) e foram mais sensíveis à perda de DA no modelo animal com reserpina (AGUIAR. et al., 2009), quando comparados com ratos exercitados. Estas alterações podem aumentar a vulnerabilidade de

neurônios dopaminérgicos e o risco de desenvolvimento da DP, e pode ser reduzida pelo exercício físico (AGUIAR. et al., 2009; VILLAR-CHEDEA et al., 2009). Além disso, vários estudos demonstraram os efeitos positivos do exercício físico em modelos animais da DP (AGUIAR, 2009; 2016a; 2016b; FISHER et al., 2004; GORTON et al., 2010; TOY et al., 2014 (para maiores detalhes ver Tabela 2).

O exercício físico em esteira durante 10 dias após a lesão dopaminérgica em dois modelos animais da DP, 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), melhorou o comportamento motor dos animais (TILLERSON et al., 2003). A melhora motora observada neste estudo foi associada a mecanismos neuroprotetores, uma vez que o exercício físico foi iniciado 12 horas após a indução da lesão, sendo que estas toxinas requerem vários dias para induzirem a morte neuronal (TILLERSON et al., 2003). O exercício físico também resultou numa diminuição da expressão do transportador de DA (DAT) em comparação com camundongos não treinados expostos ao MPTP via intraperitoneal (i.p.) (FISHER et al., 2004).

Um estudo prévio desenvolvido em nosso laboratório indicou que o protocolo de exercício físico na roda de correr ou esteira durante 4 semanas atenua a disfunção motora induzida pela injeção subcutânea (s.c.) de reserpina (5 mg/kg) em ratos (AGUIAR. et al., 2009). A reserpina, o mesmo agente utilizado por Carlsson para investigar o efeito da L-DOPA em coelhos, inibe o transportador vesicular de monoaminas (VMAT-2), impedindo o armazenamento vesicular e levando a depleção temporária dos níveis de monoaminas no SNC. Uma única injeção de reserpina (2,5 mg/kg, i.p.) reduz em 90% as concentrações estriatais de DA após 2 horas (KUCZENSKI, 1977). Além disso, o exercício físico é capaz de melhorar os prejuízos cognitivos observados após a administração de doses mais baixas de reserpina (1 mg/kg, s.c.) (AGUIAR. et al., 2009). Estes resultados indicam o potencial do exercício físico para o tratamento dos sintomas motores e não motores da DP.

Outros estudos observaram também os benefícios motores do exercício físico em modelos animais da DP baseados no uso de neurotoxinas como a 6-OHDA (AGUIAR et al., 2016b) e o MPTP (FISHER et al., 2004; PETZINGER et al., 2007; TILLERSON et al., 2003) (ver a Tabela 2), sugerindo mais uma vez o potencial

efeito neuroprotetor do exercício físico na DP. Assim, podemos inferir que os benefícios motores do exercício físico observados em pacientes com a DP (HIRSCH et al., 2003; MIYAI et al., 2000) podem estar associados a melhorias na neurotransmissão dopaminérgica e uma redução na morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos da SNpc. Há uma extensa literatura que relata que os efeitos positivos do exercício físico na função motora que parecem ser mediados, pelo menos em parte, por modificações adaptativas do sistema dopaminérgico nos núcleos da base e por circuitos motores que os integram (FISHER et al., 2004; MABANDLA et al., 2004; PETZINGER et al., 2007; TILLERSON et al., 2003).

Por exemplo, Petzinger et al. (2007), demonstraram que o exercício físico em esteira por 28 dias protegeu contra a redução dos níveis de DA no estriado em camundongos C57BL/6 tratados com MPTP. Além disso, os autores relataram que o exercício físico reduz o imunodeteção de DAT e de TH no estriado. Uma possível explicação para estes efeitos específicos regionais pode ser devido às formas de plasticidade sináptica dependentes do uso. Ou seja, o alto grau de envolvimento do estriado dorsolateral para a execução de movimentos dos membros anteriores e posteriores durante o exercício físico em esteira é apoiado por estudos que demonstram que ratos expostos ao andar em uma esteira apresentaram aumentos no fluxo sanguíneo cerebral e da atividade metabólica em circuitos motores, como o córtex motor primário e o estriado dorsolateral (BROWN; SHARP, 1995; HOLSCHNEIDER et al., 2003).

No entanto, os mecanismos exatos relacionados aos benefícios do exercício físico na DP não estão completamente esclarecidos. O exercício físico regular tem sido relacionado com um aumento no número de novas células do hipocampo (VAN PRAAG et al., 1999; VAN PRAAG; KEMPERMANN; GAGE, 1999) um aumento da plasticidade cerebral, (COTMAN; BERCHTOLD, 2002) e aumento da produção de fatores neurotróficos (AGUIAR. et al., 2008; NEEPER et al., 1996; OGONOVSKY et al., 2005). Essas mudanças estruturais estão associadas com um melhor desempenho em tarefas de memória e função motora (RUSSO-NEUSTADT et al., 2001; SCHMIDT-HIEBER; JONAS; BISCHOFBERGER, 2004; VAYNMAN; YING; GOMEZ-PINILLA, 2004).

Tabela 2: Exercício físico em modelos animais da DP.

Modelo Animal	Tipo	Intensidade/ duração	Resultados	Referência
6-OHDA no feixe prosencefálico medial em ratos Long-Evans	Rodas de correr	21 dias/ voluntário (2000 a 4000 metros/dia)	↓ de rotações induzidas por apomorфина	(MABAND LA; RUSSELL, 2010)
6-OHDA no feixe prosencefálico medial em ratos Wistar	Rodas de correr	5 semanas/ voluntário (4000 metros/dia)	↑ TH ↑ BDNF no estriado - proteção	(HSUEH et al., 2018)
MPTP i.n. em camundongos C57BL	Rodas de correr	6 semanas/ voluntário (200 a 2000 metros/dia)	não modifica DAT e dano mitocondrial	(AGUIAR. et al, 2014)
MPTP i.p. em camundongos C57BL/6	Rodas de correr	3 semanas/ 5 dias semana/ voluntário (30 min/dia)	Potencializa efeitos da L-DOPA	(ARCHER; FREDRIKS SON, 2010; FREDRIKS SON et al., 2011)
MPTP i.p. em camundongos C57BL/6	Esteira e roda de correr	6 semanas/ 5 dias semana 30 a 60 min (6,7 a 8,5 m/min)	↑ da coordenação Sem modificação de DA estriatal e 5HT	(GORTON et al., 2010)
MPTP i.p. em camundongos C57BL/6	Esteira	30 dias 2 x 30 min (10 m/min)	↓ DAT estriatal ↑ receptor DA e D2 estriatal	(FISHER et al., 2004)
MPTP i.p. em camundongos	Esteira e roda de correr	6 semanas (6,7 a 8,5 m/min)	↑ da coordenação ↓ DA estriatal e	(PETZING ER et al., 2007)

gos C57BL/6		4 semanas (5 dias semana)	TH estriatal DAT	
MPTP i.p. em camundongos C57BL/6	Esteira	20 dias 60 min (18 cm/s) (5 dias semana)	↑ DAT e TH estriatal	(SMITH; GOLDBERG; MESHUL, 2011)
MPTP i.p. em camundongos C57BL/6	Esteira	28 dias/ 30 min 2 x dia (11,4 a 13,5 m/min)	melhora cognitiva e metabolismo da DA	(AGUIAR. et al, 2016a)
MPTP i.p. em camundongos C57BL/6	Esteira	6 semanas/5 dias semana 60 min (12 m/min)	↑ TH ↑ função mitocondrial ↑ mobilidade	(JANG et al., 2018)
MPTP i.p. em camundongos C57BL/6	Esteira	4 semanas/5 dias semana 40 min (18 m/min)	↑ angiogenese estriatal	(AL-JARRAH et al., 2010)
6-OHDA i.c.v. em ratos Long-Evans	Esteira	18 semanas/5 dias semana 20 min (5 a 12 m/min)	↑ função mitocondrial	(LAU et al., 2011)
MPTP i.p. em camundongos C57BL/6	Esteira	28 dias/2 x ao dia 30 min, 5 dias/semana (10 m/min)	Alteração da expressão do receptor AMPA	(VANLEE UWEN et al., 2010)
6-OHDA intra-estriatal em ratos Fisher e		6 semanas/ 5 dias/60 min (18 a 20 m/min)	↑ expressão do receptor D2	(VUCKOVI C et al., 2010)
6-OHDA i.c.v. em ratos Long-Evans	Esteira	30 dias/2 x ao dia 20 min (13 m/min)	↑ DA estriatal e melhoras não motoras	(POULTON; MUIR, 2005)

6-OHDA intra-striatal em ratos Wistar e i.p. MPTP em camundongos C57BL/6	Esteira	30 dias/2 x ao dia 15 min (15 m/min)	↑ DA estriatal, DOPAC e HVA; ↑ TH em SNpc; ↑ caminhada	(TILLERS ON et al., 2003)
6-OHDA intra-striatal em camundongos C57BL/6	Esteira	6 semanas/5 dias semana 25 a 40 min (11,4 a 13,5 m/min)	Protege contra a lesão DA	(AGUIAR JR. et al, 2016b)
Reserpina i.p. em ratos Wistar	Rodas de correr e esteira	4 semanas/5 dias semana (roda de correr) 25 a 25 min (esteira 16,5 a 25 m/min)	↑ DA estriatal e melhoras não motoras	(AGUIAR. et al., 2009)

Legenda: ↑: aumento; ↓: diminuição; 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; MPTP: 1-metil-4-fenil-1, 2,3,6-tetrahidropiridina; i.n.: intranasal; i.p. : intraperitoneal; i.c.v. : intracerebroventricular; DA: dopamina; DOPAC: ácido 3,4-di-hidroxifenilacico; HVA: ácido homovallico; SNpc: substantia nigra parte compacta; TH: tirosina hidroxilase.

1.7.3 Exercício físico e fatores neurotróficos: importância do GDNF

O efeito do exercício físico é frequentemente associado a um aumento dos níveis de fatores neurotróficos, principalmente o BDNF (VAYNMAN et al., 20014). Os fatores neurotróficos são proteínas secretadas por neurônios e células da glia que regulam o desenvolvimento, manutenção, função e plasticidade do sistema nervoso dos vertebrados, dentre os quais se destacam o BDNF, o fator neurotrófico da dopamina cerebral (CDNF) e do fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos (MANF) e o fator neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF,

do inglês, *glial-derived neurotrophic factor*). O GDNF possui um papel neuroprotetor, ativando interações complexas entre várias cascatas de sinalização responsáveis pela diferenciação e proliferação celular, bem como a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos no cérebro adulto (PASCUAL et al., 2011). O GDNF é expresso em níveis elevados em neurônios do estriado durante o desenvolvimento pós-natal e regula a morte natural dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (AKERUD et al., 1999). Funcionalmente, o GDNF é responsável pela sinalização do complexo receptor GFR α 1-RET (receptor alfa-1 da família GDNF), que está presente em neurônios dopaminérgicos em desenvolvimento e em neurônios maduros (AIRAKSINEN; TITIEVSKY; SAARMA, 1999). A hipótese de que o GDNF é um fator neurotrófico limitante para o desenvolvimento dos neurônios dopaminérgicos da SNpc é suportada pela observação de que a administração intra-estriatal de GDNF durante o período de morte celular ontogenética suprime a apoptose dos neurônios DA da SNpc (AIRAKSINEN; TITIEVSKY; SAARMA, 1999).

Desde estas descobertas, o GDNF surgiu como um potencial agente terapêutico para doenças neurodegenerativas, incluindo a DP (COHEN et al., 2003; D'ANGLEMONT DE TASSIGNY; PASCUAL; LOPEZ-BARNEO, 2015), por regular a diferenciação neuronal, a manutenção do fenótipo e atividade sináptica, proteger os neurônios adultos de lesões mecânicas, tóxicas ou isquêmicas, e reduzir a morte de neurônios por necrose ou apoptose (AKERUD et al., 2001). O GDNF promove a sobrevivência e diferenciação de muitos outros tipos de populações neuronais, tais como neurônios motores da medula espinal e encefálicos, neurônios noradrenérgicos do tronco encefálico, neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal, neurônios entéricos, células de Purkinje do cerebelo e neurônios simpáticos e sensoriais (SANDHU et al., 2009).

Como descrito acima, além de induzir a recuperação dos tecidos, ele induz o aparecimento de axônios dopaminérgicos (BATCHELOR et al., 2000). Foi apontado como influenciador na redução da degeneração das fibras dopaminérgicas, um processo que é regulado por vias intracelulares, tais como o sistema ubiquitina-proteassoma (GONZALEZ-APARICIO; FLORES; FERNANDEZ-ESPEJO, 2010). Foi demonstrado que o GDNF poderia promover aumento de expressão de TH nos neurônios

dopaminérgicos da SN (CAO et al., 2010). A administração de GDNF aumenta a fosforilação da TH e, conseqüentemente, a atividade da TH e a síntese de DA no estriado de ratos. Estes efeitos do GDNF na atividade da TH são mediados pela ativação da MEK-1 e ERK (GONZALEZ-APARICIO; FLORES; FERNANDEZ-ESPEJO, 2010).

O trabalho inicial sobre a eficácia do GDNF em modelos animais da DP envolveu o estudo dos efeitos protetores de injeções de GDNF intra-estriatal laterais sobre a lesão dopaminérgica (AOI et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de GDNF restaura o imunoconteúdo de TH após a lesão induzida por 6-OHDA em ratos (KIRIK et al., 2001). Estes resultados indicam que o GDNF tem propriedades tanto de proteção como de reparação (administrado antes ou após a lesão, respectivamente), proporcionando melhorias mais consistentes na sobrevivência neuronal dopaminérgica e crescimento de fibras dopaminérgicas.

Um estudo prévio mostrou que a administração i.c.v. de GDNF (duas injeções com 4 semanas de intervalo) em modelo de MPTP em macacos foi capaz de atenuar as LIDs (IRAVANI et al., 2001). Essa modificação parece estar relacionada à sua capacidade de restaurar parcialmente a transmissão dopaminérgica. Após a administração i.c.v., o GDNF foi capaz de reverter a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc (IRAVANI et al., 2001). Curiosamente, em modelo de lesão por 6-OHDA em ratos foi observado que o exercício físico em esteira (30 min por dia, 5 dias consecutivos/semana) por 4 semanas com início 24 horas após a injeção de 6-OHDA, aumentou os níveis de GDNF e BDNF. O aumento dos níveis de GDNF foi observado em ambos os hemisférios (lesionado e não lesionado). Esses animais também apresentaram aumento no conteúdo de TH assim como melhora nos testes motores (TAJIRI et al., 2010).

1.7.4 Efeitos do exercício físico sobre as LIDs

Além dos benefícios do exercício físico relatados anteriormente na DP, um estudo clínico aplicou dois tipos de protocolos de exercício físico em pacientes discinéticos. Os pacientes foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos, ambos com 4 semanas de treinamento: RI (reabilitação intensiva,

duas vezes ao dia) e o RNI (reabilitação não intensiva, uma vez ao dia). O protocolo RI consistiu em exercícios de flexibilidade e posturais na primeira sessão e na segunda sessão exercícios de marcha com pistas visuais, esteira ergométrica e treino de transferências posturais como treino da transferência de deitado para sentado por exemplo. O protocolo RNI consistia em: exercícios de flexibilidade, posturais e treinos de marcha. Os pacientes do grupo RI obtiveram uma melhor resposta clínica ao tratamento farmacológico com L-DOPA permitindo uma redução na dosagem e consequentemente menos discinesias (FRAZZITTA et al., 2012a). Esses pesquisadores acompanharam esses pacientes por 6 meses e observaram que os resultados benéficos encontrados no grupo RI são mantidos ao longo do tempo (FRAZZITTA et al., 2012b). Sendo assim, estes estudos forneceram evidências científicas de que o exercício físico pode ser considerado um suporte terapêutico não invasivo relevante para pacientes parkinsonianos que sofrem de discinesias, permitindo uma redução na dosagem do tratamento medicamentoso bem como os efeitos adversos relacionados (FRAZZITTA et al., 2012a,b).

Alguns trabalhos correlacionam a redução no escore das LIDs após o exercício físico como uma consequência da alteração farmacocinética da L-DOPA. Um estudo realizado por Goetz et al., 1993, não encontrou benefícios do exercício físico vigoroso em bicicleta estacionária, iniciado 1 hora após a administração de L-DOPA, na função motora de pacientes parkinsonianos. No entanto, observou que o grupo exercitado apresentou uma tendência para máxima concentração de L-DOPA no plasma somente nos primeiros 30 minutos após a sua administração, e se manteve menor que o grupo sedentário ao longo de 4 horas. Outro grupo de pesquisa observou uma diminuição das LIDs em pacientes que realizaram exercício em um ciclo ergômetro por duas horas. No entanto, apesar da existência uma tendência para diferença de concentração plasmática de L-DOPA nestes pacientes, eles não observaram uma alteração estatisticamente significativa com o exercício (REUTER et al., 2000).

De acordo com o trabalho clínico de Frazitta et al. (2012) relatado anteriormente, um estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou pela primeira vez o potencial antidiscinético do exercício físico sobre as LIDs em camundongos C57BL/6 submetidos a lesão unilateral com 6-OHDA (12 µg)

(AGUIAR et al., 2013). Neste estudo, os animais lesionados com 6-OHDA foram treinados em roda de correr (exercício voluntário) por 14 dias juntamente com o tratamento diário da associação L-DOPA (25 mg/kg, i.p.) + benserazida (12,5 mg/kg). O exercício diminuiu as discinesias do tipo axial e de membros, mas não as orofaciais. Além disso, neste mesmo trabalho, os efeitos antidiscinéticos do exercício voluntário foram associados com a normalização da sinalização dopaminérgica no estriado, especificamente, a hiperfosforilação de DARPP-32 (regulado por DA e AMPc proteica de fosfoproteína de 32 kDa) e expressão de c-Fos. Recentemente, Klemann et al. (2017) demonstraram que o exercício físico em esteira durante 4 semanas em camundongos submetidos ao modelo da DP induzido pela administração i.p. de MPTP modula algumas alterações neuroquímicas induzidas pela L-DOPA. Os autores relataram que o exercício físico controlado em esteira (30 minutos por dia durante 28 dias) alterou principalmente a expressão de mRNAs para TH na SN e na região ventral do estriado que regulam a sinalização dopaminérgica.

Diante do exposto acima, existem evidências, tanto em pacientes parkinsonianos quanto em modelos animais da DP, de que o exercício físico pode representar um agente modificador na DP, apresentando efeitos neuroprotetores, bem como melhorando os sintomas motores e as LIDs. Para testar esta hipótese, é importante a utilização de protocolos de exercício físico em esteira ergométrica, onde a intensidade e volume de treinamento possam ser controlados e permitam investigar as modificações moleculares e eletrofisiológicas no estriado decorrentes do tratamento crônico com L-DOPA.

1.8 OBJETIVOS

1.8.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antidiscinético do exercício físico controlado em esteira em camundongos com hemiparkinsonismo induzido pela injeção intra-estriatal de 6-OHDA e investigar a sua capacidade em atenuar algumas alterações moleculares e eletrofisiológicas induzidas pelo tratamento crônico com L-DOPA.

1.8.2 Objetivos específicos

– Caracterizar o modelo de discinesias induzidas por diferentes doses de L-DOPA/benserazida em camundongos *Swiss* albinos.

– Investigar os efeitos do exercício em esteira sobre o desenvolvimento das LIDs em camundongos das linhagens *Swiss* albinos e C57BL/6 hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA.

– Investigar possíveis benefícios no desempenho motor induzidos pelo exercício físico em esteira em camundongos hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA e tratados cronicamente com L-DOPA através das medidas do teste de exaustão, testes do cilindro e rotarod.

– Investigar possíveis alterações no imunodeteção de TH e DAT (usados como marcadores de neurônios dopaminérgicos) e de GDNF no estriado em camundongos hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA e tratados cronicamente com L-DOPA.

– Investigar os efeitos do exercício físico sobre a plasticidade sináptica no estriado em camundongos hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA e tratados cronicamente com L-DOPA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos fornecidos pelo biotério central da UFSC (2-3 meses, 25-30 g), após mantidos no biotério setorial do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) do Departamento de Farmacologia (Universidade Federal de Santa Catarina). Os animais foram mantidos em gabinetes climatizados a $23 \pm 1^\circ \text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 h (fase clara 7:00- 19:00 h) livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos desta tese estão de acordo com os padrões éticos e legais de experimentação animal de órgãos nacionais e internacionais [(i) guia para cuidado e uso de animais de laboratório do *National Institute of Health* e (ii) Diretrizes do Conselho da Comunidade Europeia n° 86/609/EEC de 24/10/1986]] e foram aprovados pela Comissão de Ética para o uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob protocolo n° PP357.

Os experimentos de eletrofisiologia e imunohistoquímica foram realizados no Laboratório de Eletrofisiologia do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra (Portugal), sob supervisão do professor Rodrigo Cunha. Nestes experimentos, foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos (2-3 meses, 25-30 g) fornecidos pelo Laboratório Charles River (Barcelona, Espanha). Os animais foram mantidos em gabinetes climatizados a $23 \pm 1^\circ \text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 h (fase clara 7:00- 19:00 h) livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos utilizados no presente estudo foram previamente aprovados Órgão Responsável pelo Bem-estar Animal (ORBEA) protocolo 138-2016/1507201.

2.2 DROGAS

Este trabalho utilizou manipulação farmacológica para três objetivos: (i) modelagem experimental do Parkinsonismo, (ii) desafios com fármacos dopaminérgicos frente à neurodegeneração induzida pela 6-OHDA; e, (iii) estudo de plasticidade sináptica estriatal.

Os fármacos foram administradas pelas vias intraperitoneal (i.p.) ou subcutânea (s.c.) no volume de 10 ml/kg de massa corporal, utilizando agulha hipodérmica curta 25 x 5 mm. A apomorfina (cloridrato de R(-)-apomorfina, agonista não seletivo dos receptores dopaminérgicos) foi usada nas doses de 0,5 e 0,6 mg/kg, s.c. A L-DOPA (cloridrato do éster metílico de L-3,4-dihidroxifenilalanina) foi usada nas doses de 25; 30; 50 e 70 mg/kg, i.p.. A benzerasida (cloridrato de benserazida, inibidor periférico da enzima descarboxilase de L-aminoácidos aromática) foi usada nas doses de 12,5; 15; 25 e 35 mg/kg, i.p. A amantadina (cloridrato de amantadina, antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA) foi usada como anti-discinético padrão na dose de 60 mg/kg, i.p. Foram utilizados os anestésicos cloridrato de cetamina (90-120 mg/kg i.p.) associada a xilasina (10 mg/kg, i.p.) para os camundongos *Swiss* albinos. Já os camundongos C57BL/6 foi utilizado o tribromoetanol (12-14 µg/kg i.p.). O tratamento *in vitro* em fatias estriatais foi usado o cloridrato de dopamina (5; 10; 50 ou 100 µM por fatia). Devido à natureza oxidante da 6-OHDA e da R(-)-apomorfina, empregou-se como solução veículo livre de oxigênio o metabissulfito de sódio 0,1% (Na₂S₂O₅) em camundongos *Swiss* albinos e o ácido ascórbico 0,02% (C₆H₈O₆) em camundongos C57BL/6. O veículo da solução de L-DOPA e benserazida foi tampão fosfato (KH₂PO₄, 4 mM; Na₂HPO, 16 mM; NaCl, 115 mM, em pH 7,4). Para as outras drogas foi utilizada a solução salina (NaCl 0,9%) como veículo. Para os experimentos eletrofisiológicos com cloridrato de dopamina foi utilizado o ácido ascórbico 0,02% dissolvido em fluido cérebro espinhal artificial (ACSF) como veículo.

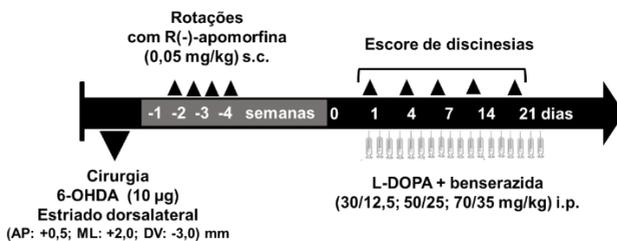
2.3 DESENHOS EXPERIMENTAIS

2.3.1 Bloco experimental 1 – Avaliação dose-resposta das LIDs em camundongos *Swiss* albinos

O bloco experimental 1 (ilustrado na Figura 8) teve como objetivo padronizar o modelo de LIDs em camundongos *Swiss* albinos e avaliar: (i) a assimetria de apoio das patas dianteiras após lesões unilaterais com 6-OHDA; (ii) a supersensibilidade de receptores dopaminérgicos, (iii) a neurodegeneração induzida pela administração intra-estriatal de 6-OHDA. Os animais foram

anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e cetamina (90-120 mg/kg, i.p.) e receberam uma micro-injeção de 6-OHDA (10 µg dissolvido em 0.1% metabisulfito de sódio diluído in 0.9% NaCl), no estriado direito através de cirurgia estereotáxica usando as seguintes coordenadas: AP: +0,5 mm; ML: +2,0 mm; DV: -3,0 (DA CONCEIÇÃO et al., 2010). Após quatro semanas para a estabilização da lesão, foram usadas diferentes doses repetidas de L-DOPA + benserazida (um inibidor da enzima DOPA-descarboxilase periférica) para a indução de LIDs: (i) 30 mg/kg L-DOPA + 15 mg/kg benserazida; (ii) 50 mg/kg L-DOPA + 25 mg/kg benserazida e (iii) 70 mg/kg L-DOPA + 35 mg/kg benserazida (LUNDBLAD et al., 2004, 2005). O protocolo experimental utilizado para modelar as LIDs foi baseado em trabalhos prévios da literatura (PAVÓN et al., 2006; SANTINI et al., 2007).

Figura 8 - Experimento 1: Modelo experimental de LIDs em camundongos *Swiss* albinos.

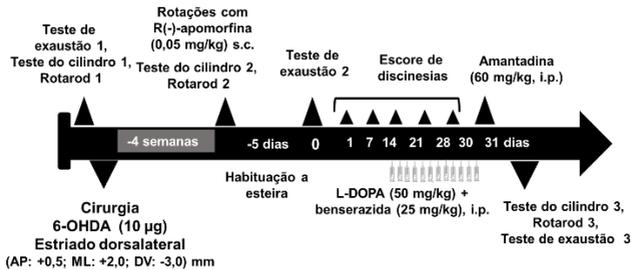


Legenda: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina.

2.3.2 Bloco experimental 2 – Efeitos do exercício físico em esteira sobre as LIDs em camundongos *Swiss* albinos

O bloco experimental 2 (ilustrado na Figura 9) teve como objetivo verificar a hipótese de que o exercício físico em esteira poderia reduzir as LIDs assim como avaliar: (i) os prejuízos motores, (ii) a supersensibilidade de receptores dopaminérgicos, e (iii) a neurodegeneração induzida pela administração intra-estriatal de 6-OHDA em camundongos *Swiss* albinos, (iv) modificação do padrão discinético dos animais submetidos ao exercício físico.

Figura 9 - Experimento 2: Efeitos do exercício físico em esteira sobre as LIDs em camundongos *Swiss* albinos.



Legenda: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina

A injeção intra-estriatal de 6-OHDA seguiu os mesmos procedimentos descritos no bloco experimental anterior (dose e coordenadas de injeção). Após quatro semanas de recuperação cirúrgica, os animais receberam a administração diária de L-DOPA (50 mg/kg, i.p.) e benserazida (25 mg/kg, i.p.) durante 4 semanas. Deste modo, todos os animais foram submetidos à cirurgia e ao tratamento com L-DOPA/benserazida. Durante este período, os animais foram divididos no grupo sedentário (controle) e exercitado, sendo que neste grupo foram submetidos ao exercício físico diário, cinco dias por semana, com intervalos aos finais de semana (Figura 9). Deste modo, foi possível construir dois grupos experimentais: (i) 6-OHDA, L-DOPA/benserazida sedentário, e (ii) 6-OHDA, L-DOPA/benserazida exercitado em esteira.

Uma esteira ergométrica foi adaptada para simular o exercício físico de corrida em camundongos. O exercício, volume semanal e intensidade de corrida foram padronizados durante a fase clara do ciclo dos animais (entre 16:00-18:00 h). Não foi utilizado nenhum estímulo nocivo para estimular a corrida nos animais. Todos os animais, inclusive os sedentários, foram transportados para a sala da esteira 1 h antes do início do exercício. O grupo sedentário foi posicionado na esteira desligada e permaneceu pelo mesmo tempo que grupo exercitado. Após a última semana de intervenção com exercício físico, os animais foram submetidos aos últimos testes comportamentais (Figura 9), e em seguida foram sacrificados por deslocamento cervical ao final dos experimentos para dissecação do estriado, que foi armazenado a -80°C para a realização dos ensaios bioquímicos.

2.3.3 Bloco experimental 3 – Investigação de parâmetros eletrofisiológicos córtico-estriatal de camundongos C57BL/6 com LIDs e submetidos a exercício físico em esteira

O bloco experimental 3 (ilustrado na Figura 10) teve como objetivo verificar as possíveis modificações de plasticidade córtico-estriatal após o exercício físico em animais discinéticos. Desta forma, avaliar os efeitos do exercício físico em esteira sobre: (i) o escore de discinesias (ii), a neurodegeneração induzida pela administração intra-estriatal de 6-OHDA, (iii) plasticidade estriatal induzida pela administração crônica de L-DOPA em camundongos C57BL/6.

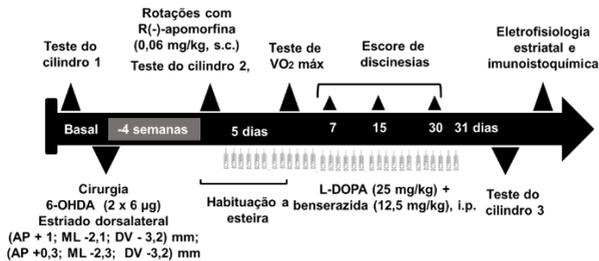
Os animais foram anestesiados (tribromoetanol 12-14 µg/kg, i.p.) e receberam duas injeções de 6-OHDA (total de 12 µg dissolvido em 0.1% ácido ascórbico diluído in 0.9% NaCl) no estriado direito [(i) AP +1 mm, ML -2,1 mm, DV - 3,2 mm, e (ii) AP +0,3 mm, ML -2,3 mm, DV -3,2 mm]. Após quatro semanas de recuperação cirúrgica, os animais receberam uma administração diária de L-DOPA (25 mg/kg, i.p.) e benserazida (12,5 mg/kg, i.p.). Deste modo, todos os animais foram submetidos à cirurgia e ao tratamento com L-DOPA/benserazida. Durante este período, os animais foram divididos no grupo sedentário (controle) e exercício físico que foram submetidos ao exercício diário durante cinco dias por semana, com intervalos aos finais de semana (Figura 10). Deste modo, foi possível construir os seguintes grupos experimentais: (i) 6-OHDA, salina; (ii) 6-OHDA, L-DOPA/benserazida sedentário; (iii) 6-OHDA + L-DOPA/benserazida exercitado em esteira.

Uma esteira ergométrica para camundongos foi utilizada (*Touchscreen Treadmill (Panlab) – Harvard Apparatus*), com cinco baias individuais. O exercício, volume semanal e intensidade de corrida (para maiores detalhes ver figura 28) foram padronizados durante a fase clara do ciclo dos animais (entre 16:00-18:00 h). A intensidade do choque elétrico aplicada durante a fase de habituação foi de 0,1 mA para estimular a corrida nos animais. Todos os animais, inclusive os sedentários, foram transportados para a sala da esteira 1 h antes do início do exercício físico.

Após a última semana de intervenção com exercício físico, os animais foram submetidos aos últimos a última avaliação do AIM escore e após o último teste de cilindro (Figura 10), e depois foram sacrificados por deslocamento cervical ao final dos

experimentos, para realização dos experimentos *in-vitro* de eletrofisiologia extracelular na via córtico-estriatal. As fatias utilizadas nestes experimentos foram posteriormente perfundidas em paraformoldeído (4%) seguida de sacarose (30%) para realização de ensaios de imunohistoquímica.

Figura 10 - Desenho experimental 3: Parâmetros eletrofisiológicos estriatais em camundongos C57BL/6 com discinesias induzidas por L-DOPA submetidos ao exercício físico em esteira.



Legenda: 6-OHDA, 6-hidroxidopamina

2.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

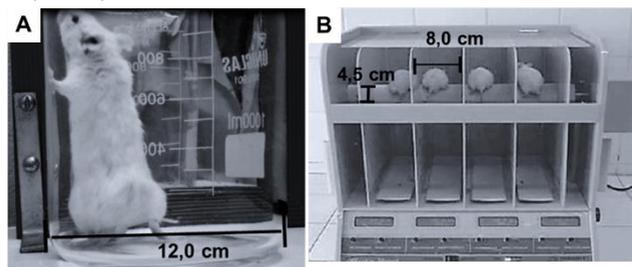
Os animais foram transportados à sala de experimentos climatizada para ambientação 1 h antes do início das tarefas comportamentais, realizados durante a fase clara do ciclo (14:00-19:00 h). Após cada experimento, o aparato foi limpo com álcool 10%. Todos os experimentos foram registrados em vídeo e analisados no software ANYmaze (Stoelting Co., EUA). Os testes do cilindro, rotarod e teste de exaustão foram realizados em três momentos: (1) medida basal; (2) quatro semanas após a cirurgia de micro-injeção de 6-OHDA, e (3) após quatro semanas de tratamento com L-DOPA com ou sem exercício físico.

2.4.1 Cilindro

O teste do cilindro (Figura 11A) é utilizado para avaliar assimetria de apoio das patas dianteiras após lesões unilaterais em núcleos motores do SNC (MABANDLA; RUSSELL, 2010; TAJIRI et al., 2010). Os animais dos experimentos 2 e 3 foram posicionados dentro de um cilindro transparente (12 cm de diâmetro e 15 cm de altura) para registro durante 3 min dos

contatos das patas dianteiras na parede do cilindro (SCHALLERT; WOODLEE, 2003). O escore do cilindro foi calculado como viés contralateral (ROOF et al., 2001). Foram computados os atos de encostar das patas ipsilateral e contralateral à lesão, assim como de ambas as patas simultaneamente na parede do cilindro. Foi controlado o valor basal de cada animal (antes da cirurgia), e os animais foram reavaliados quatro semanas após a cirurgia de micro-injeção de 6-OHDA e quatro semanas após o tratamento com L-DOPA (Figuras 9 e 10, desenho experimental 2 e 3). Os eventos foram registrados em vídeo e analisados em câmera lenta na velocidade reduzida de 0,5x utilizando o Software Windows Movie Maker®.

Figura 11 - Testes para avaliação da assimetria (esquerda) e coordenação motora (direita).



Legenda: Teste do cilindro para avaliar assimetria de apoio das patas (12 cm de diâmetro e 15 cm de altura). (A). Rotarod (Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP), medindo 8 centímetros de largura e com diâmetro de 4,5 (B).

2.4.2 Rotarod

O sistema de rotarod (modelo EEF 412, Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP) (Figura 11B) avalia a coordenação motora e equilíbrio de roedores sobre um cilindro em rotação (AGUIAR. et al., 2009; PETZINGER et al., 2007). No bloco experimental 2, foi realizada a medida do teste basal de cada animal (antes da cirurgia), e os animais foram reavaliados quatro semanas após a cirurgia de micro-injeção de 6-OHDA e quatro semanas após o tratamento com L-DOPA. Primeiramente, os animais foram condicionados no cilindro estacionário (zero RPM) durante 30 s, seguido pelo cilindro a velocidade constante de 5

RPM durante 90 s (AGUIAR. et al., 2009; CORDOVA et al., 2012; JIANG et al., 2004). Os animais com número de quedas superior a cinco foram descartados das sessões de teste (5 animais), a fim de que todos os grupos apresentassem a mesma medida motora basal. Após 30 min, os animais foram testados na versão do rotarod com aceleração, velocidade inicial de 5 RPM e aceleração 0,1 revolução/s (JIANG et al., 2004). Na sessão de teste, o animal foi colocado no rotarod e a sua latência para queda e aceleração de queda foram determinadas, sendo considerado o tempo máximo de teste de 300 s. A aceleração na sessão de teste ocorreu após 60 s com rotação fixa em 5 RPM.

24.3 Teste de exaustão

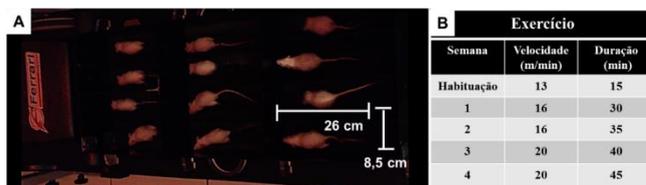
Esse teste foi realizado no bloco experimental 2. Inicialmente, os animais foram habituados ao treino em esteira durante 10 minutos por quatro dias consecutivos em velocidade mínima de esteira adaptada (1 km/h = 16 m/min). Os animais pertencentes ao grupo sedentário foram apenas posicionados na esteira parada pelo mesmo tempo.

A capacidade máxima de realização do esforço foi realizada no quinto dia, estimada pelo teste progressivo até a exaustão em esteira humana adaptada. A velocidade inicial da esteira foi de 1 km/h = 16 m/min, com 3° de inclinação. A cada 3 minutos, a velocidade da esteira sofria um acréscimo de 0,2 km/h até a exaustão do animal, ou seja, o teste terminava quando o animal não conseguia manter o padrão de deambulação mecânica da corrida após estímulos suaves dos manipuladores. As medidas avaliadas foram: a velocidade final alcançada (m/min); o tempo total em (minutos) e a distância total percorrida (m) para cada animal durante o teste (AGUIAR et al., 2018). O teste foi realizado em três momentos: medida basal, após quatro semanas de lesão por 6-OHDA e após quatro semanas de tratamento com L-DOPA. Os grupos sedentário e exercitado foram avaliados quando a capacidade máxima em três momentos: (i) avaliação basal; (ii) quatro semanas após a cirurgia e (iii) após quatro semanas de treinamento. No entanto, apenas o grupo exercitado realizou a última avaliação após 4 semanas de treinamento na esteira.

2.4.4 Treino em esteira

Primeiramente, foi calculada a média alcançada na velocidade máxima no teste de exaustão, na segunda avaliação (após quatro semanas de cirurgia com 6-OHDA). Os animais do grupo exercitado do bloco experimental 2 foram submetidos a um protocolo de exercício físico em esteira diário, cinco dias por semana, com intervalos de descanso aos finais de semana (AGUIAR et al., 2016b) (Figura 12A). O protocolo de exercício adotado teve caráter progressivo, pois o volume e a intensidade de corrida foram aumentados semanalmente (AGUIAR et al., 2016b) (Figura 12B).

Figura 12- Esteira ergométrica adaptada para camundongos e parâmetros de exercício físico utilizados.



Legenda: Esteira humana adaptada com velocidade reduzida, anexado um aparato de acrílico com 12 baias individuais (centro, vista de cima) (A). Protocolo de exercício físico adotado teve caráter progressivo, o volume e a intensidade de corrida foram aumentados semanalmente, utilizando de critérios de treinamento físico (B).

2.4.5 Teste de VO₂ máximo

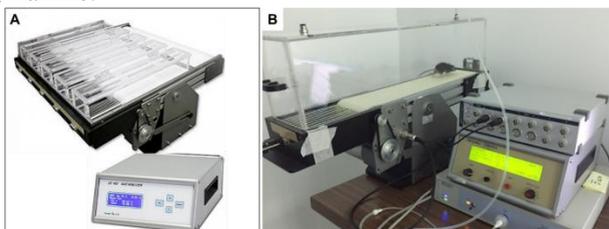
No bloco experimental 3, inicialmente os roedores foram habituados em esteira ergométrica *Panlab LE8710, Harvard apparatus*® (velocidade entre 8-10 m/min) durante três dias com intervalos de 24 horas entre cada sessão (Figura 13A). A velocidade inicial da esteira foi de 8 a 12 m/min (8,7% grau de inclinação).

O teste do VO₂ máximo (ergoespirometria) em cada animal individualmente foi realizado no quarto dia após o início da habituação em esteira, utilizando a mesma inclinação e com aumentos de velocidade a cada 3 min. A cada 2 minutos, a velocidade da esteira sofria um acréscimo 5 cm/s até a exaustão do

animal, ou seja, caracterizada quando estes resistem a correr apesar de estimulados por leve choque (0,2 mA) (AGUIAR et al., 2018). Ao fim do teste, registrou-se o tempo total e a velocidade final, sendo obtida a velocidade máxima alcançada com o VO_2 máximo dos animais. A medida de VO_2 máximo foi monitorada constantemente com sistema fechado para avaliação de gases em tempo real (Figura 13B).

Após a determinação do VO_2 máximo pela ergoespirometria, o protocolo de treinamento inicial foi determinado em 60% do VO_2 máximo atingido no teste individual. (para maiores detalhes ver Figura 28, resultados) Os animais realizaram o treinamento em baias individuais em uma esteira para camundongos *OxyletPro System - Treadmill - Panlab®* (Figura 13A). Os animais do bloco experimental 3 receberam L-DOPA desde a semana de habituação e foram exercitados após a habituação por mais três semanas, durante 5 dias consecutivos e pausando aos finais de semana.

Figura 13 – Esteira ergométrica e equipamento utilizado para determinar o VO_2 máximo.



Legenda: Esteira Panlab LE8710, Harvard apparatus® conectada ao controlador de velocidade para utilização de protocolos de habituação e treinamento em camundongos. (A). Esteira OxyletPro System - Treadmill - Panlab® conectada ao avaliador de gases hermeticamente fechada para a determinação do VO_2 máximo (B).

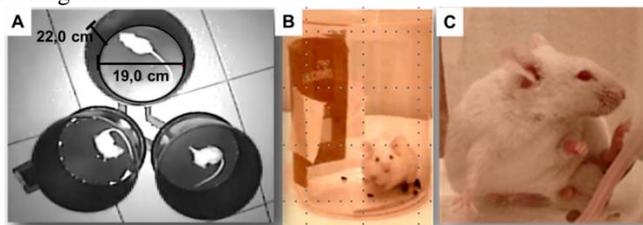
2.5 DESAFIOS FARMACOLÓGICOS

2.5.1 Rotações induzidas por R(-)-apomorfina

A desnervação pré-sináptica unilateral no estriado causa supersensibilidade de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos que pode ser demonstrada através da indução de comportamentos

de rotação pela administração de drogas que potencializem a neurotransmissão dopaminérgica (ex: D-anfetamina) ou agonistas dos receptores dopaminérgicos [ex: R(-)-apomorfina] (IANCU et al., 2005). O comportamento de rotação apresenta duas características fundamentais de acordo com (ALEXANDER; CRUTCHER; DELONG, 1990): (i) assimetria, de orientação contralateral [R(-)-apomorfina] ou ipsilateral (D-anfetamina) ao lado lesionado, e (ii) frequência diretamente dependente do grau da lesão. O desafio com R(-)-apomorfina foi realizado para selecionar os animais hemiparkinsonianos nos blocos experimentais 1, 2 e 3 (Figura 8, 9 e 10, respectivamente), e para acompanhar semanalmente a evolução da lesão no bloco experimental 1, durante quatro semanas após a lesão com 6-OHDA (Figura 8). Os camundongos foram posicionados em cilindros individuais (\varnothing 19 cm, 22 cm de altura, Figura 14A) para registro do comportamento rotacional durante a habituação de 5 min, e após a injeção de R(-)-apomorfina (0,5 mg/kg, s.c., no experimento 1 e 0,6 mg/kg, s.c, nos experimentos 2 e 3) durante 30 min. As rotações ipsi/contralaterais (em relação ao lado da cirurgia) foram avaliadas através da plataforma ANY-mazeTM.

Figura 14 - Aparatos utilizados para experimentos dos desafios farmacológicos.



Legenda: Tubos de cilíndricos utilizados para o teste de rotação com apomorfina (\varnothing 19 cm, 22 cm de altura) (A). Cilindro transparente (\varnothing 12 cm e 15 cm de altura) para as avaliações de discinesias (B) Exemplo de comportamento discinético: membro anterior, cabeça e torção axial (C).

2.5.2 Discinesias induzidas pela L-DOPA

Quatro semanas após a micro-injeção intra-estriatal de 6-OHDA, os animais dos blocos experimentais 1, 2, e 3 foram tratados com injeções diárias de L-DOPA combinada com benserazida, um inibidor da enzima DOPA-descarboxilase

periférica (CEDARBAUM et al., 1986; PAPAVALIIOU et al., 1972). No bloco experimental 1 foram usadas as doses de 30/12,5 mg/kg, 50/25 mg/kg e 70/35 mg/kg durante 3 semanas. No bloco experimental 2 na dose de 50/25 mg/kg durante 4 semanas. No bloco experimental 3 na dose de 25/12,5 mg/kg durante 4 semana. Estas doses foram baseadas em trabalhos prévios da literatura (LUNDBLAD et al., 2004; PAVÓN et al., 2006). As discinesias em roedores são classificadas em quatro subtipos de acordo com sua topografia (LUNDBLAD et al., 2004)

i) discinesia das patas anteriores, distonia ou movimentos hipercinéticos da pata anterior no plano sagital ou frontal

ii) discinesia axial, posturas torcidas do tronco superior e pescoço, orientados contra lateralmente ao lado da cirurgia

iii) discinesia orolingual, espasmos da musculatura orofacial, e protrusão da língua orientada contra lateralmente ao lado da cirurgia

iv) discinesia de locomoção, movimento circular com viés ao lado contralateral da cirurgia.

As discinesias das patas, axial, orofacial, e locomoção foram avaliadas no bloco experimental 1 em: 1, 4, 7, 14 e 21 dias; no bloco experimental 2 em: 1, 7, 14, 21, 28 e 30 dias; e no bloco experimental 3 em: 1, 15 e 30 dias de tratamento com L-DOPA. As avaliações das LIDs foram realizadas em cilindros individuais (\varnothing 12 cm, 15 cm de altura, Figura 14 B) durante 120 min após a injeção de L-DOPA, através de registro manual em intervalos de 10 min (patas, axial, orolingual e locomoção, Figura 14 C). A amantadina (60 mg/kg, i.p.) foi usada como controle anti-discinético e administrada 90 min antes da avaliação das discinesias.

2.6 EXPERIMENTOS BIOQUÍMICOS

2.6.1 Imunodeteção de proteínas

Quarenta minutos após a última injeção de L-DOPA/benserazida (50/25 mg/kg, i.p.), os animais do bloco

experimental 2 foram eutanasiados por deslocamento cervical, o estriado foi dissecado e armazenado a -80°C . As amostras de estriado foram mecanicamente homogeneizadas em 400-500 μL mM de Tris-base em pH 7,0 com EDTA 1 mM, NaF 100 mM, Na_3VO_4 2 mM, Triton X-100 a 1%, 10% v/v glicerol e um *cocktail* de inibidores proteicos da Sigma Aldrich (Alemanha). As amostras foram centrifugadas (1.000 xg, 10 min, 4°C) para obter os sobrenadantes, seguido de uma diluição de 1/1 (v/v) em 100 mM Tris-base em pH 6,8 com 4 mM de EDTA 8%, SDS 20%, glicerol 8% -mercaptoetanol.

As amostras (60 μg proteína/por poço em BSA como padrão proteico) foram separadas em 10% por poço. As proteínas foram então transferidas para membranas de nitrocelulose usando equipamento semi-seco para transferência de membranas (1,2 mA / cm^2 ; 1,5 h). Interações não específicas foram bloqueadas com 5% de leite em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5, 1 h). A imunodeteção foi realizada utilizando anticorpos primários policlonais anti-TH de camundongos (1:1000, Santa Cruz®), anti-DAT (1: 1000, Santa Cruz®) ou anti-GDNF (1:1000, Santa Cruz®). Os anticorpos foram diluídos em TBS-T (TBS com Tween-20 0,05%, pH 7,5), contendo albumina de soro bovino (0,5%). As reações foram reveladas pelo ECL. A cada passo de bloqueio e incubação, as membranas foram lavadas 3x (durante 5 min cada) com TBS-T. As densidades ópticas das bandas foram normalizadas por actina e plotada em unidades arbitrárias (au). Esses experimentos foram realizados no laboratório LEXDON, Santa Catarina - Brasil.

2.6.2 Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi realizada para a quantificação da imunomarcagem de TH, usada como parâmetro para a avaliação da ação neuroprotetora após 4 semanas de exercício físico (bloco experimental 3). As fatias estriatais coronais (400 μm) utilizadas nos experimentos de eletrofisiologia foram perfundidas em uma solução de paraformaldeído 4% (0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,1 M NaCl, pH 7,4) seguida por mais dois dias de sacarose 30% em PBS. Em seguida, as fatias foram lavadas com PBS e coladas a uma base de agarose

Sigma-Aldrich® em 3% e cortadas em espessura de 50 µm. Para todos os passos seguintes, o tampão A (PBS 0,1 M, Triton X-100 0,15%) foi utilizado para diluição das soluções. Na seguinte ordem, as seções *free-floating* foram incubadas em: (i) H₂O₂ 0,3% (30 min) para inibição da atividade da peroxidase endógena, (ii) soro de cabra 5% (60 min) para bloqueio das reações inespecíficas, e anticorpo primário anti-TH 1:1.000 (IgG, monoclonal para camundongo) (Merck Milipore AB-152, Alemanha) (56 h, 4°C), (iv) anticorpo secundário 1:200 (2 h) (IgG, Vector Labs, Burlingame CA, EUA), (v) complexo Biotina-Avidina 1:125 (1 h) (Vectastain® ABC Kit, Vector Labs, Burlingame CA, EUA). Entre cada etapa, as fatias foram lavadas em tampão A (3x durante 5 min a temperatura ambiente) em PBS. As fatias foram incubadas em uma solução DAB (3,3'tetrahidrocloro de diaminobenzidina) em PBS, e reveladas com H₂O₂ 1:5 DAB durante 1-2 min. Todas as incubações e lavagens foram realizadas em agitadores do tipo Kline. Finalmente, as seções foram montadas em lâminas gelatinizadas (24x 60 mm), e desidratadas em banhos consecutivos (30 s) de H₂O, (60s) de etanol 70%, 95% 100% e (30s) de xilenol 100%. As lâminas foram coladas com Eukit na sua respectiva lamínula e deixadas para secar por 24 h. Após as seções histológicas foram analisadas no microscópio óptico Epifluorescence Microscope, Zeiss (Imager.Z2) para (i) registro fotográfico do estriado (objetiva 1x); (ii) analisar a densidade óptica média do TH no estriado (n = 10 fatias/animal) através da plataforma ImageJ (1.44p, *National Institute of Health*, EUA). Esses experimentos foram realizados no laboratório Purinas em Coimbra – Portugal.

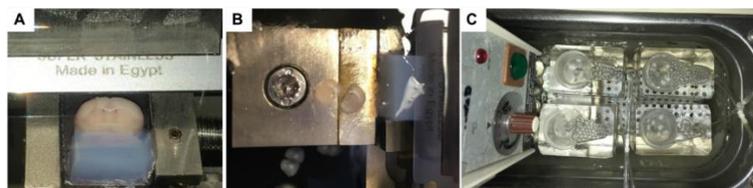
2.7 ELETROFISIOLOGIA EXTRACELULAR CÓRTICO-ESTRIATAL

2.7.1 Eletrofisiologia extracelular córtico-estriatal de animais discinéticos sedentários e exercitados

Ao final do bloco experimental 3, fatias coronais do estriado (do hemisfério lesionado com 6-OHDA) foram obtidas dos animais hemiparkinsonianos C57Bl/6 tratados com salina ou L-DOPA durante 4 semanas dos grupos sedentário e exercitados. Os

animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os encéfalos foram rapidamente coletados e imersos em líquido cefalorraquidiano artificial (aCSF) gelado contendo (em mM); 124 de NaCl, 4,5 de KCl, 2 de CaCl₂, 1 de MgCl₂, 26 de NaHCO₃, 1,2 de NaH₂PO₄ e 10 de D-glicose, gazeados com uma mistura de 95% O₂ / 5% CO₂ (Figura 15 A-C).

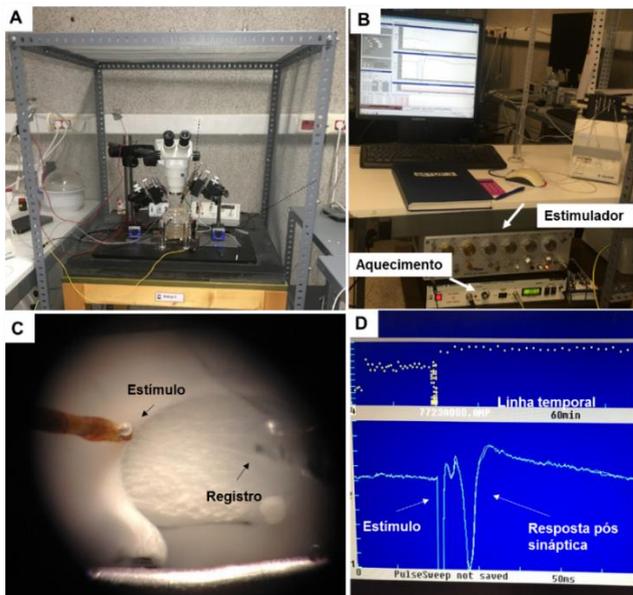
Figura 15 - Cortes coronais de fatias estriatais.



Legenda: Encéfalo imerso em fluido cérebro espinhal posicionado no Vibratome 1500, Leica, Wetzlar, Alemanha para realizar fatias coronais (A). Fatias coronais de 400 μ m divididas nos dois hemisférios (lesionado com 6-OHDA não lesionado) (B). Fatias mantidas em banho aquecido a temperatura de 31° graus por uma hora para recuperação da lesão devido aos cortes no vibrátomo (C).

O tecido foi completamente submerso em ACSF gelado e seccionado no sentido coronal em fatias de 400 μ m de espessura, utilizando um sistema de secção (Vibratome 1500, Leica, Wetzlar, Alemanha) (Figura 15 A-B). As fatias permaneceram em repouso por no mínimo 90 minutos em temperatura ambiente, imersas em ACSF e continuamente gazeadas a 95% de O₂ / 5% de CO₂ (Figura 15C). As fatias foram então transferidas para a câmara de registro submerso em ACSF na instalação de equipamentos para a medida de parâmetros de eletrofisiologia extracelular (Figura 16A).

Figura 16 - Imagem do sistema de eletrofisiologia extracelular utilizado.



Legenda: Lupa posicionada para visualização das fatias para correto posicionamento dos eletrodos (A). Equipamentos de estimulação elétrica das fatias e aquecimento do ACSF (B). Posicionamento dos eletrodos do eletrodo de estímulo na região do corpo caloso e da pipeta de registro na região dorsolateral em uma fatia córtico-estriatal de camundongo (C). Registro típico estriatal de uma *population spike* obtido após ao protocolo HFS. ACSF, fluido cérebro espinal artificial; HFS, *high frequency stimulation* (D).

Os potenciais de campo extracelulares foram obtidos com micropipetas (2– 4 M Ω) preenchidas com uma solução de 4 M de NaCl. Os estímulos elétricos foram gerados por um estimulador S44 (Grass Instruments, West Warwick, RI, EUA) (Figura 16 A-B) em uma frequência de 0,05 Hz, através de um eletrodo bipolar posicionado na matéria branca sobre o estriado dorso-medial (Fig 16 C). As leituras foram medidas como *Population Spikes*, para estimativa da eficácia sináptica (Figura 16 D) (CALABRESI et al., 1992; PICCONI et al., 2003).

Primeiramente foi analisada a amplitude máxima de sinal córtico-estriatal dorsolateral de cada fatia, realizando a curva de estímulo-resposta conhecida como curva *input e output* (I/O). O

"input" corresponde a medida da resposta pré-sináptica, enquanto o "output" corresponde a medida da resposta pós-sináptica. Essa curva é frequentemente usada como uma medida indireta da viabilidade das fatias para as análises de parâmetros eletrofisiológicos. Para isso foi utilizado um protocolo de estímulo de intensidade que iniciava em 50 μA e terminava em 200 μA . Após a curva I/O foi utilizado o protocolo de estimulação de alta frequência (do inglês *high frequency stimulation*, HFS), consistiu em de 3 trens de 100 Hz durante 1 segundo com intervalos de 10 segundos entre os trens, durante aplicação da estimulação tetânica a amplitude máxima de estímulo encontrada na I/O foi utilizada (CALABRESI et al., 1992). O eletrodo de estímulo foi posicionado na região do corpo caloso próxima a região estriatal dorsolateral. O eletrodo de registro foi posicionado no estriado dorsolateral. Os registros foram obtidos por um amplificador ISO-80 (World Precision Instruments, Hertfordshire, Inglaterra) e digitalizados por um sistema ADC- 42 (Pico Technologies, Pelham, NY, EUA). As médias de 3 respostas consecutivas foram continuamente monitoradas em um computador com o software Win LTP® versão 2.20b (Universidade de Bristol). Esses experimentos foram realizados no laboratório Purinas em Coimbra – Portugal.

2.7.2 Eletrofisiologia extracelular córtico-estriatal com diferentes concentrações de dopamina

Um segundo grupo de experimentos de eletrofisiologia extracelular foi realizado com animais C57BL/6 sem qualquer tratamento prévio, cirurgia ou exercício (n=6 animais *naïve*). Essas fatias estriatais foram tratadas com diferentes concentrações de DA (5, 50 e 100 μM) durante 30 minutos antes do protocolo de HFS, adicionada ao ACSF com concomitante adição ácido ascórbico (20 μM), utilizado como antioxidante. As alterações de amplitude máxima de sinal foram analisadas antes e após o tratamento com DA. Após a avaliação da plasticidade sináptica basal foi aplicada as fatias o mesmo protocolo de HFS utilizado no bloco experimental 3, as fatias foram avaliadas quanto a modificações na plasticidade córtico-estriatal durante 40 minutos.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

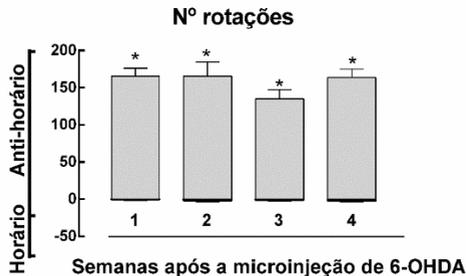
A plataforma utilizada para a análise estatística foi o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, EUA). Para confecção dos gráficos foi utilizada a plataforma GraphPad Prism 6. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). A comparação entre as médias foi realizada com o teste t de *Student* nos testes de rotações com apomorfina e para os subtipos de discinesias. A avaliação durante as semanas nas rotações foi utilizada a análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, assim como durante os dias e minutos de avaliação do escore de discinesias. Os resultados dos protocolos envolvendo exercício físico e tratamentos foram avaliados pela ANOVA de duas vias com medidas repetidas e o teste post-hoc de Newman-Keuls, quando necessário. O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 PADRONIZAÇÃO DAS DISCINESIAS INDUZIDAS POR L-DOPA (LIDs) EM CAMUNDONGOS SWISS ALBINOS

A Figura 17 ilustra os resultados de rotação contralaterais avaliados semanalmente após a injeção unilateral intra-estriatal de 6-OHDA mais a administração subcutânea de apomorfina. O teste t de *Student* para amostras dependentes mostrou diferença significativas em todas as semanas das rotações no sentido anti-horário (contralaterais a lesão) em relação as rotações no sentido horário (rotações ipsilaterais a lesão): semana 1 ($t_{(0,05;10)}=15,20$, $P<0,05$) semana 2 ($t_{(0,05;10)}=8,45$, $P<0,05$) semana 3 ($t_{(0,05;10)}=10,91$, $P<0,05$) e semana quatro ($t_{(0,05;10)}=14,93$, $P<0,05$).

Figura 17 - Número de rotações contralaterais avaliadas semanalmente após a injeção unilateral intra-estriatal de 6-OHDA.



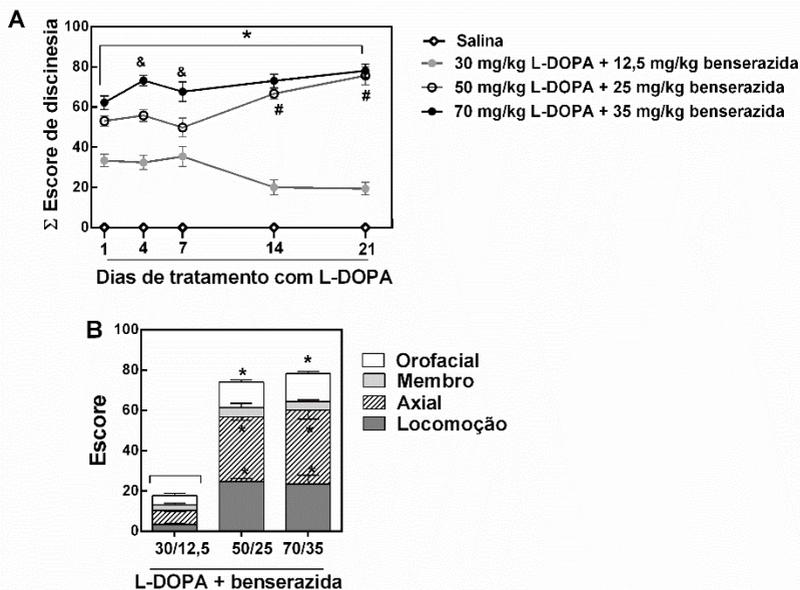
Legenda: Os camundongos receberam uma injeção (6-OHDA, 10 μ g) no estriado direito. As rotações contralaterais após a administração subcutânea de R(-)-apomorfina (0,05 mg/kg). Análise estatística realizada por teste t de *Student* para amostras dependentes* $P<0,05$ comparado as rotações ipsilaterais no mesmo período. Os dados foram expressos pela média + EPM (todos os animais de todos os grupos n=30).

Após a confirmação da efetividade da lesão induzida por 6-OHDA com o desafio farmacológico com R(-)-apomorfina, os animais foram divididos em 4 grupos para a avaliação dos efeitos de diferentes doses de L-DOPA e benserazida sobre a indução de LIDs durante os 120

minutos que seguem a administração de L-DOPA, durante as 4 semanas de tratamento em dias diferentes (Figura 18).

A ANOVA com medidas repetidas revelou um efeito significativo do tratamento com L-DOPA sobre o escore total de discinesias [$F(3,21)=76,29$, $P<0,05$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou um aumento significativo no escore total de discinesias nas doses de 50/20 e 70/35 mg/kg de L-DOPA/benserazida em relação a dose de 30/12,5 mg/kg de L-DOPA/benserazida (Figura 18 A). O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou diferenças significativas da dose de 50/25 mg/kg nos dias 14 e 21 em relação ao dia 1 ($P<0,05$), bem como da dose 70/35mg/kg nos dias 4 e 7 ($P<0,05$) em relação a dose de 50/25 mg/kg (Figura 18 A). Em relação aos subtipos de discinesias, último dia de avaliação (dia 21), foi possível observar que as doses de 50/25 e 70/35 mg/kg diferiram da dose de 30/12,5 nas discinesias orofacial, axial e locomoção (Figura 18 B).

Figura 18 - Escore total de discinesias induzidas por diferentes doses de L-DOPA.



Legenda: Os animais lesionados com 6-OHDA foram tratados por 21 dias consecutivos com L-DOPA/benserazida em diferentes doses e foram avaliados ao escore de discinesias nos dias 1, 4, 7, 14 e 21 de tratamento (A). Subtipos de discinesias obtidas separadamente nas doses diárias de 50/25 mg/kg, 60/30 mg/kg e de 70/35 mg/kg de L-DOPA/ benserazida (B). Os dados foram avaliados pela ANOVA de medidas repetidas para os dias de tratamento e os subtipos de discinesias, seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPm A: *P<0,05 todas doses de L-DOPA/benserazida vs. salina; & P<0,05 L-DOPA/benserazida 70/35 mg/kg vs. dose de 50/25 mg/kg; #P<0,05 L-DOPA/benserazida 50/25 mg/kg vs dia 1. B: * P<0,05 subtipos de discinesias em relação a dose de 30/12,5 (n=6-8 animais por grupo).

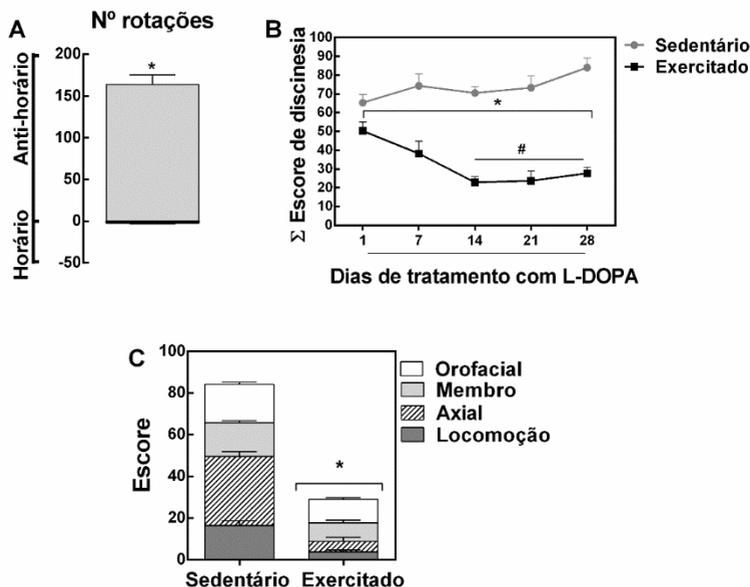
3. 2 EFEITOS ANTIDISCINÉTICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ESTEIRA EM CAMUNDONGOS SWISS ALBINOS

Primeiramente, neste novo grupo experimental foi realizado o teste de rotação com apomorfina após quatro semanas da injeção unilateral de no estriado com 6-OHDA. O teste de comportamento rotatório induzido por R(-)-apomorfina produziu uma média de

aproximadamente 150 rotações contralaterais (sentido anti-horário) a micro-injeção de 6-OHDA nos animais hemiparkinsonianos [$t(0,05;10)=14,93$, $P<0,05$] em relação ao lado ipsilateral (sentido horário) (Figura 19A).

Dando início a análise dos resultados do programa de exercícios, foi possível observar uma redução das LIDs na segunda semana, entretanto, sem diferenças significativas em relação ao primeiro dia de avaliação. Na avaliação realizada no 14º dia, o grupo exercitado apresentou uma redução significativa no escore total de discinesias [$F(4,16)=3,17$, $P<0,05$] sendo que essa redução se manteve até o 28º dia. Foi observada também uma redução do escore do grupo exercitado em relação ao sedentário [$F(1,16)=64,05$, $P<0,001$] (Figura 19B).

Figura 19 - Número de rotações contralaterais à lesão com 6-OHDA induzidas por apomorfina e efeito do exercício físico sobre as discinesias induzidas por L-DOPA.

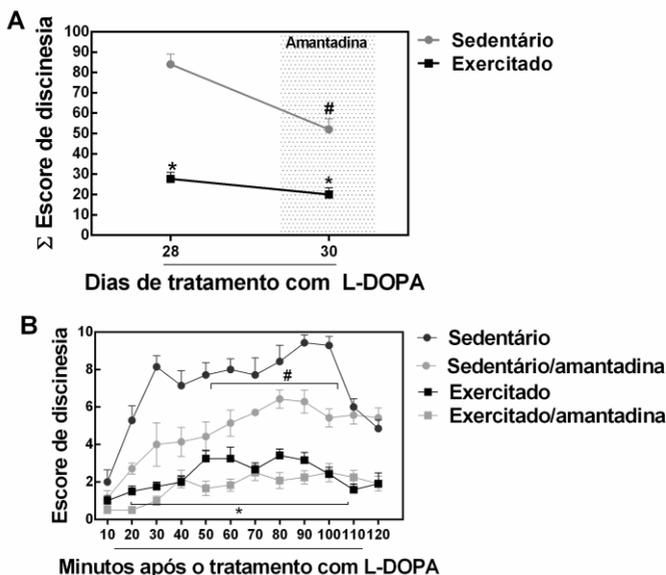


Legenda: Os animais lesionados com 6-OHDA foram inicialmente testados quanto ao número de rotações contralaterais à lesão induzidas pela R(-)-apomorfina após 4 semanas da indução da lesão. Em seguida, os mesmos animais foram divididos em 2 grupos (exercitado e sedentário) que receberam injeções diárias de L-DOPA/benserazida (50/25 mg/kg) e foram avaliados em relação ao escore total de discinesias nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de tratamento. Foi empregado teste t de *Student* para a análise estatística das rotações induzidas por apomorfina e para os tipos de discinesias e a ANOVA com medidas repetidas para os escores totais de discinesias durante os diferentes períodos de avaliação. Os dados representam a média + EPM (n=8-12 animais por grupo). A: * $P < 0,05$ em relação as rotações ipsilaterais. B: # $P < 0,05$ grupo exercitado vs primeiro dia de avaliação, * $P < 0,05$ vs. grupo sedentário. C: * $P < 0,05$ vs tipos de discinesias grupo sedentário.

O teste t de *Student* indicou que no 28º dia de avaliação das discinesias, os animais exercitados apresentaram uma redução significativa em todos os subtipos de discinesias em comparação ao grupo sedentário ($P < 0,05$) (Figura 19C).

A amantadina (60 mg/kg, i.p.), um fármaco utilizado clinicamente no tratamento das discinesias (BLANCHET; KONITSIOTIS; CHASE, 1998; CROSBY; DEANE; CLARKE, 2003; SCHWAB et al., 1969), foi administrada 90 minutos antes da administração de L-DOPA no dia 30 (último dia de avaliação). O teste t de *Student* mostrou que o grupo sedentário apresentou uma redução significativa de LID no 30º dia de tratamento com L-DOPA mais o pré-tratamento com amantadina em comparação ao 28º dia de tratamento com L-DOPA ($P < 0,05$) (Figura 20 A). Já no grupo exercitado, a amantadina induziu uma pequena redução, porém não significativa, no escore de LID no dia 30º dia quando comparado ao 28º dia ($P > 0,05$) (Figura 20 A). A ANOVA com medidas repetidas mostrou que o grupo exercitado obteve menor escore de LID em comparação ao grupo sedentário em ambas as medidas [$F(1,16)=16,80$, $P < 0,05$] (Figura 20A).

Figura 20 – Efeitos do tratamento com amantadina sobre as LIDs em animais sedentários e exercitados, comparação do 28º dia de tratamento com o 30º dia.



Legenda: A amantadina (60 mg/kg, i.p.) foi administrada 90 minutos antes da administração de L-DOPA/benserazida (50/25 mg/kg, i.p.) no 30º dia (A). O escore de discinesias foi avaliado durante 120 minutos. Avaliação do escore total de discinesias durante 120 minutos do 28º e 30º dias. Usou-se a ANOVA com medidas repetidas seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPM (n=8-12 animais por grupo). A: # P<0,05 vs. grupo sedentário no dia 28; * P<0,05 vs. Sedentário. B: *P<0,05 grupo sedentário e exercitado amantadina vs. demais grupos, # sedentário 28º dia vs. sedentário com amantadina 30º dia.

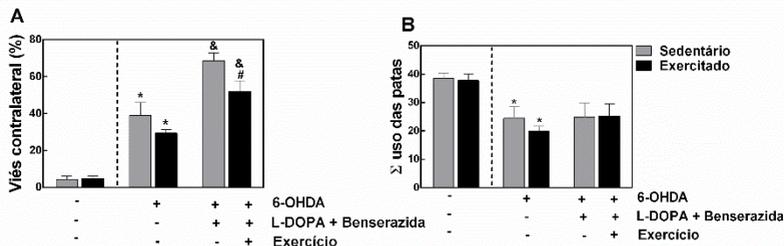
Quando avaliados os 120 minutos após a administração de L-DOPA no 28º dia e 30º dia, a ANOVA com medidas repetidas mostrou uma diferença entre os grupos durante o tempo de tratamento [F(1,30)=6,85, P<0,05]. O grupo exercitado (com ou sem a amantadina) apresentou menores escores de discinesias em comparação aos grupos sedentários (com ou sem amantadina) (P<0,05). No entanto, o grupo sedentário com amantadina (30º dia) mostrou redução no escore de discinesia em comparação ao sedentário sem amantadina (28º dia) a partir

de 50 minutos até 100 minutos após administração da L-DOPA ($P < 0,05$) (Figura 20B).

3.3 EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM L-DOPA ASSOCIADA AO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE A ASSIMETRIA MOTORA DE CAMUNDONGOS HEMIPARKINSONIANOS

O teste do cilindro foi realizado em três momentos, como descrito anteriormente (ver item 2.3.2). A ANOVA de medidas repetidas seguida do post-hoc de Newman-Keuls mostrou que na avaliação basal, os animais dos grupos exercitado e sedentário não apresentaram diferenças significativas quanto a assimetria das patas e ao uso total das patas (Figura 21 A e B, barras a esquerda) ($P > 0,05$). Após quatro semanas da lesão unilateral com 6-OHDA, os animais apresentaram uma maior assimetria no uso das patas [$F(1,17)=67,21$, $P < 0,05$] (Figura 21 A, ao centro). Os animais do grupo sedentário e exercitado apresentaram um aumento do uso da pata esquerda ao final do tratamento crônico com L-DOPA [$F(1,17)=7,86$, $P < 0,05$]. No entanto, o grupo discinético exercitado apresentou uma diminuição no uso do viés contralateral em relação ao grupo discinético sedentário [$F(1,17)=8,43$, $P < 0,05$] (Fig 21 A).

Figura 21 – Efeitos do tratamento com L-DOPA e exercício físico sobre os prejuízos motores induzidos pela lesão com 6-OHDA em camundongos *Swiss* albinos.



Legenda: Os animais lesionados com 6-OHDA (10 μ g) pertencentes aos grupos sedentário e exercitados foram testados na medida basal, após quatro semanas de cirurgia e ao final do tratamento com L-DOPA (40 minutos após a última administração). Avaliação percentagem da assimetria das patas dianteira dos animais sedentários e exercitados (A). Uso total das patas dos animais sedentários e exercitados (B). Os dados representam a média + EPM (n=8/12 por grupo) e foram analisados pela ANOVA com medidas repetidas, seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. *P < 0,05 em relação as medidas basais e # em relação ao sedentário tratado com L-DOPA; & em relação a lesão com 6-OHDA.

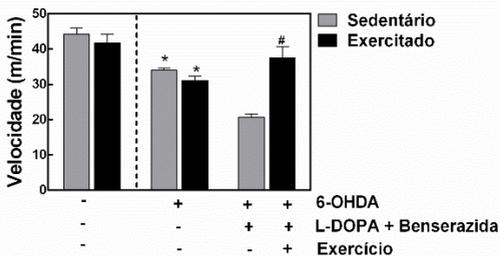
A ANOVA com medidas repetidas indicou uma redução no uso total das patas nos animais dos grupos exercitados e sedentários após quatro semanas da micro-injeção de 6-OHDA [F(1,17)=37,57, P<0,05] (Figura 21 B, barras ao centro), sendo que este parâmetro não foi alterado pelo tratamento com a L-DOPA [(F(1,17)=0,49, P>0,05)] (Figura 21 B, a direita).

3.4 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O DESEMPENHO E A COORDENAÇÃO MOTORA DE ANIMAIS DISCINÉTICOS

Após a ambientação em esteira, os animais foram submetidos ao teste de exaustão basal, quatro semanas após a lesão com 6-OHDA e ao final das quatro semanas de administração de L-DOPA nos grupos sedentários e exercitados. A ANOVA mostrou que quatro semanas após a lesão com 6-OHDA, os animais de ambos os grupos (sedentários ou exercitados) apresentaram uma diminuição na velocidade total no teste de exaustão em relação aos parâmetros basais [(F(1,17)=83,59, P<0,05]

(Figura 22 barras ao centro). Após quatro semanas de treinamento em esteira, os animais exercitados apresentaram um aumento na velocidade total no teste de exaustão [$F(1,17)=27,48$, $P<0,05$] (Figura 22 barras a direita).

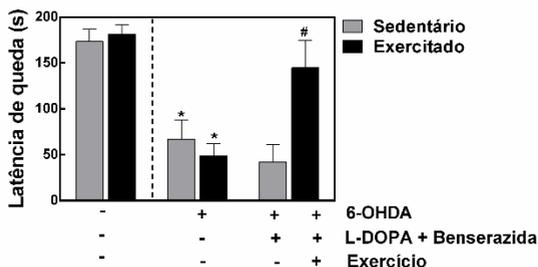
Figura 22 – Efeitos do exercício físico e do tratamento com L-DOPA sobre o desempenho de camundongos hemiparkinsonianos avaliados no teste de exaustão em esteira.



Legenda: Os animais lesionados com 6-OHDA (10 μ g) dos grupos sedentários e exercitados foram submetidos a uma avaliação de velocidade máxima (km/h) antes (medida basal) e após quatro semanas de cirurgia e ao final do tratamento com L-DOPA (24 h após a última administração). Os resultados foram avaliados pela ANOVA medidas repetidas, seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPM (n=8/12 por grupo). * $P<0,05$ em relação as medidas basais e # em relação ao grupo sedentário tratado com L-DOPA.

A coordenação motora dos animais foi avaliada no teste do rotarod (JIANG et al., 2004; PETZINGER et al., 2007). Os grupos não diferiram entre si, tanto na avaliação basal quanto após quatro semanas da micro-injeção de 6-OHDA. No entanto, ambos os grupos apresentaram uma diminuição significativa na latência para queda do rotarod após quatro semanas da injeção intra-estriatal de 6-OHDA [$F(1,17)=75,92$, $P<0,05$] (Figura 23, ao centro). Ao final das quatro semanas de tratamento com L-DOPA (quarenta minutos após a última administração), os animais exercitados apresentaram uma maior latência para a queda do rotarod [$F(1,17)=7,84$, $P<0,05$] (Figura 23 a direita).

Figura 23 - Efeitos do exercício físico e do tratamento com L-DOPA sobre o desempenho de camundongos hemiparkinsonianos avaliados no teste do rotarod.

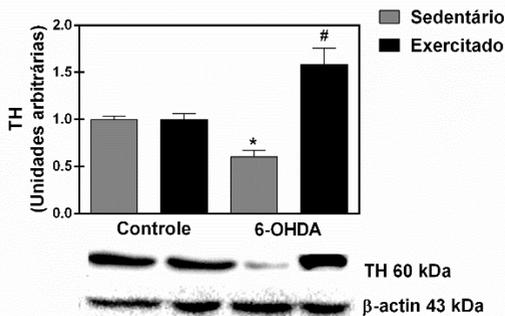


Legenda: Os animais lesionados com 6-OHDA (10 μ g) avaliados no rotarod em 3 períodos: antes da cirurgia (medida basal), quatro semanas após a lesão com 6-OHDA e ao final de 4 semanas do tratamento com L-DOPA (40 minutos após a última administração). Os resultados foram avaliados pela ANOVA de medidas repetidas, seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPM (n=8/12 por grupo). *P<0,05 em relação as medidas basais e # P<0,05 em relação ao grupo sedentário tratado com L-DOPA.

3.5 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ESTEIRA SOBRE O IMUNODETECÇÃO DE TIROSINA HIDROXILASE (TH) NO ESTRIADO DE CAMUNDONGOS DISCINÉTICOS

A lesão dopaminérgica no estriado ipsilateral induzida pela 6-OHDA foi confirmada através da imunodeteccção da enzima TH (Figura 24). A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do tratamento com 6-OHDA (10 μ g no estriado dorsolateral direito) [F(1,20)= 28,65, P<0,05]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que a 6-OHDA provocou uma redução significativa de aproximadamente 45% no imunocontéudo de TH no estriado lesionado (barra cinza, a direita) em comparação ao estriado contralateral (não lesionado). O exercício físico foi capaz de aumentar significativamente o imunodeteccção de TH no estriado lesionado com 6-OHDA em comparação ao lado controle não lesionado [(F1,20)= 20,23, P<0,05] (Figura 24).

Figura 24 – Efeitos do exercício físico sobre o imunoconteúdo da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado controle (contralateral) ou lesionado com 6-OHDA de camundongos tratados durante 4 semanas com L-DOPA.

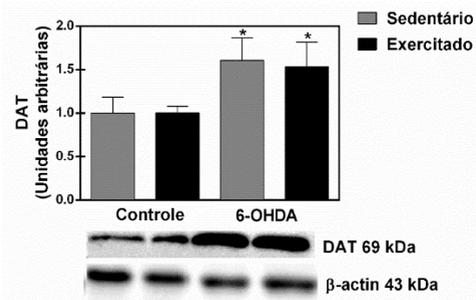


Legenda: Avaliação do imunoconteúdo de TH nos estriados dos hemisférios não lesionado (controle) e lesionado (6-OHDA) em camundongos discinéticos dos grupos sedentário e exercitado tratados com L-DOPA (50/25 mg/kg, i.p.) durante quatro semanas. Os resultados foram analisados pela ANOVA de duas vias seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPM (n=6 por grupo). *P<0,05 sedentário 6-OHDA vs. exercitado 6-OHDA; # P<0,05 vs. controle.

3.6 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ESTEIRA SOBRE O IMUNOCONTEÚDO DO TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT) NO ESTRIADO DE CAMUNDONGOS DISCINÉTICOS

A Figura 25 mostra os efeitos do tratamento crônico com L-DOPA/benserazida (50/25 mg/kg, i.p.) e do exercício físico em esteira durante 4 semanas sobre o imunoconteúdo do transportador de dopamina (DAT) no estriado de camundongos lesionados com 6-OHDA. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do tratamento com 6-OHDA sobre o imunoconteúdo de DAT [F(1,20)= 11,54, P<0,05]. Por outro lado, a ANOVA indicou ausência de efeitos significantes para o fator exercício [F1,20= 1,55, P>0,05], bem como para o fator interação 6-OHDA vs. exercício [(F1,20)= 0,06, P>0,05]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que os grupos sedentário e exercitado apresentaram um aumento no imunoconteúdo de DAT no lado lesionado com 6-OHDA em comparação ao lado não lesionado (controle) (Figura 25).

Figura 25 - Efeitos do exercício físico sobre o imunocontéudo do transportador de dopamina (DAT) no estriado controle (contralateral) ou lesionado com 6-OHDA de camundongos tratados durante 4 semanas com L-DOPA.

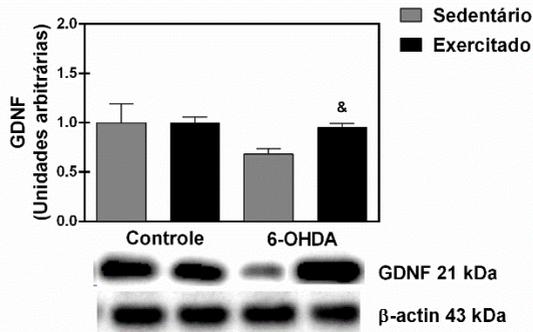


Legenda: Avaliação do imunocontéudo de DAT nos estriados dos hemisférios não lesionado (controle) e lesionado (6-OHDA) em camundongos discinéticos dos grupos sedentário e exercitado, tratados com L-DOPA (50/25 mg/kg, i.p.) durante quatro semanas. Os resultados foram analisados pela ANOVA de duas vias seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPM (n=6 por grupo). * $P < 0,05$ controle do respectivo grupo.

3.7 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ESTEIRA SOBRE O IMUNOCONTEÚDO DO GDNF NO ESTRIADO DE CAMUNDONGOS DISCINÉTICOS

O exercício físico foi capaz de aumentar o imunocontéudo de GDNF no hemisfério lesionado com 6-OHDA dos animais exercitados. A ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo do fator exercício [$F(1,20) = 9,05$, $P < 0,05$] sobre o imunocontéudo estriatal de GDNF. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que 4 semanas de tratamento com L-DOPA (50/25 mg/kg, i.p.) (Figura 26).

Figura 26 - Efeitos do exercício físico sobre o imunocnteúdo do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) no estriado controle (contralateral) ou lesionado com 6-OHDA de camundongos tratados durante 4 semanas com L-DOPA.

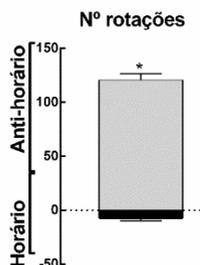


Legenda: Avaliação do imunocnteúdo de GDNF do lado não lesionado (controle) e lado lesionado (6-OHDA) em camundongos discinéticos dos grupos sedentário e exercitado, tratados com L-DOPA (50/25 mg/kg, i.p.) durante quatro semanas. Usou-se a ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPM (n=6 por grupo). * $P < 0,05$ vs. grupo sedentário. 6-OHDA – 6-hidroxidopamina; GDNF, fator neurotrófico derivado de células da glia.

3.8 CONFIRMAÇÃO FARMACOLÓGICA DA LESÃO POR INJEÇÃO INTRA-ESTRIATAL DE 6-OHDA EM CAMUNDONGOS C57BL/6

Primeiramente, como realizado no bloco experimental 1 e 2 para a confirmação farmacológica da lesão, o desafio farmacológico com R(-)-apomorfina foi realizado quatro semanas após a injeção intra-estriatal de 6-OHDA (12 μ g) em camundongos C57BL/6. Os camundongos do bloco experimental 3, lesionados com 6-OHDA apresentaram um maior número de rotações anti-horárias (contralaterais a lesão) em comparação com as rotações ipsilaterais (lado da lesão) ($P < 0,05$) (Figura 27).

Figura 27 - Número de rotações induzidos pela administração de R(-)-apomorfina em camundongos C57BL/6 lesionados com 6-OHDA.

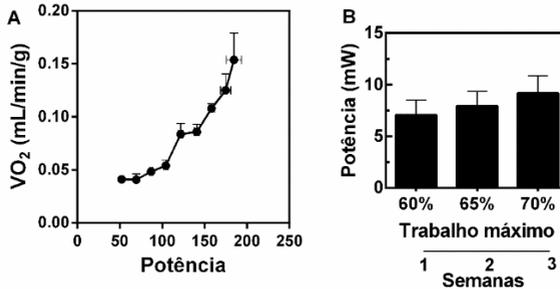


Legenda: A avaliação das rotações horárias (ipsilaterais) e anti-horárias (contralaterais) induzidas pela apomorfina (0,6 mg/kg, s.c.) foi realizada quatro semanas após a micro-injeção de 6-OHDA (12 µg) no estriado direito. A análise estatística foi realizada através do Teste t de *Student* para amostras dependentes. Os dados representam a média + EPM (n=26). * P < 0,05 comparados as rotações horárias.

3.9 ERGOESPIROMETRIA E PROTOCOLO DE TREINAMENTO

Após a habituação em esteira por três dias o teste de VO₂ máximo foi realizado no quinto dia para determinar a potência de 60% na semana inicial de exercício físico (Figura 28 A). A partir do teste foi determinado o início do treino em 60% do VO₂ máximo na primeira semana com aumentos progressivos na velocidade (P>0,05) em cada semana, calculada a partir do trabalho de cada animal (massa em grammas), cada um com o treino individualizado (Figura 28 B).

Figura 28 - VO₂ máximo alcançado após a habituação em esteira e determinação do protocolo de treinamento.

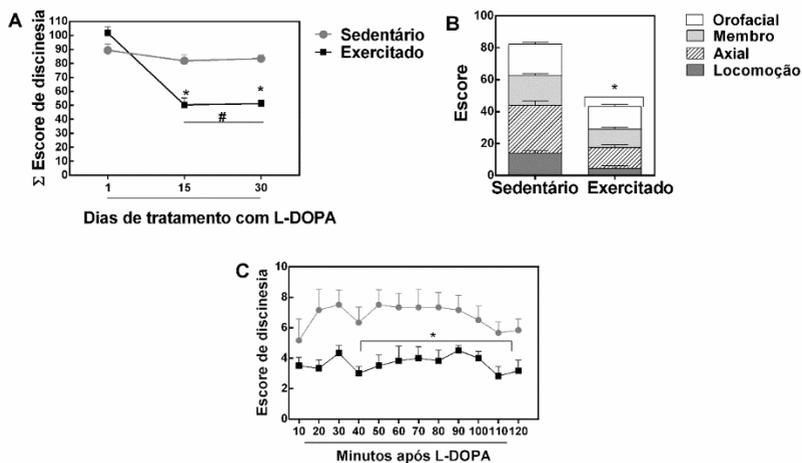


Legenda: Após 4 semanas da micro-injeção de 6-OHDA (12 µg), os animais foram testados em seu VO₂ máximo (ergoespirometria) (A). Nas três semanas de protocolo de exercício físico a potência máxima foi calculada semanalmente, determinando aumentos de 5% a cada semana (B) A ANOVA de uma via primeira semana vs. demais semanas ($P > 0,05$). VO₂, consumo de oxigênio; mW potência.

3.10 OS EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO EM ESTEIRA COMO ATENUADOR DAS DICINESIAS EM CAMUNDONGOS C57BL/6 HEMIPARKINSONIANOS

A ANOVA com medidas repetidas indicou efeitos significantes para os fatores exercício [$F(2,34) = 25,72$; $P < 0,05$] e tempo [$F(2,34) = 45,20$, $P < 0,05$] nos escores de LIDs. O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que o exercício em esteira reduziu as LIDs de camundongos C57BL/6 hemiparkinsonianos avaliados no 15º e 30º dias (Figura 29A). Além disso, foi observada uma redução significativa nos escores de discinesias do grupo exercitado nos dias 15 e 30 em comparação com o dia 1 (Figura 29 A).

Figura 29 Efeitos do exercício em esteira durante 4 semanas sobre o escore total e subtipos de discinesias induzidas por L-DOPA em camundongos C57BL/6 lesionados com 6-OHDA.



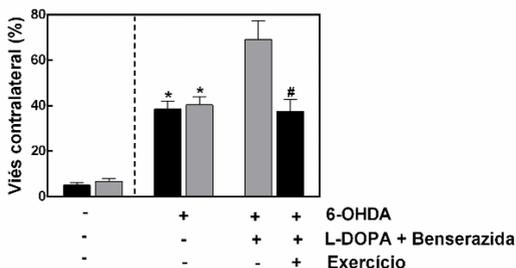
Legenda: Camundongos C57BL/6 receberam a injeção intra-estriatal de 6-OHDA (12 µg) e após 4 semanas foram divididos nos grupos sedentário e exercício, e receberam administrações diárias de L-DOPA/benserazida (25/12,5mg/kg, i.p.), e foram avaliados em relação ao escore total de discinesias nos dias 1, 15 e 30 (A). Subtipos de discinesias avaliadas separadamente no 30º dia de avaliação (B). Escore de discinesias dos grupos sedentário e exercitado durante os 120 minutos no 30º dia de avaliação (C). Os resultados dos subtipos de discinesias foram analisados pelo teste t de Student e os demais resultados foram analisados pela ANOVA com medidas repetidas seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPM (n=6-12 por grupo). *P<0,05 vs. grupo sedentário; #P<0,05 vs. primeiro dia.

Em relação aos subtipos de discinesias, o teste t de *Student* mostrou diferença do grupo exercitado em comparação com grupo sedentário em todos os subtipos de discinesias no 30º dia de avaliação (Figura 29 B). A ANOVA de medidas repetidas mostrou diferenças durante os 40 aos 110 minutos de avaliação, quando comparada ao grupo sedentário no 30º dia de avaliação [F(1,110)= 7, P<0,05] (Figura 29 C).

3.11 EFEITOS DO TRATAMENTO COM L-DOPA E EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE OS PREJUÍZOS MOTORES EM CAMUNDONGOS C57BL/6 HEMIPARKINSONIANOS

O teste do cilindro foi realizado em três momentos, como descrito anteriormente (ver item 2.3.3), da mesma forma que no bloco experimental 2. Na avaliação basal, os animais dos grupos exercitado e sedentário não apresentaram diferenças significativas viés de uso da pata contralateral (Figura 30, barras a esquerda) ($P > 0,05$). A ANOVA de medidas repetidas seguida do post-hoc de Newman-Keuls mostrou que após quatro semanas da lesão unilateral 6-OHDA (12 μg), os animais apresentaram um aumento do uso da pata ipsilateral em relação a contralateral assim como encontrados em camundongos *Swiss* albinos, eles apresentaram viés contralateral em relação a avaliação basal [$F(1,23)=54,21$, $P < 0,05$] (Figura 30, ao centro). Os animais do grupo sedentário e exercitado apresentaram um aumento do apoio com ipsilateral ao final do tratamento crônico com L-DOPA e quarenta minutos após a última administração da droga em comparação com o fator 6-OHDA [$F(1,23)=9,86$, $P < 0,05$]. Ao final do tratamento, o grupo discinético exercitado apresentou uma diminuição no uso da pata contralateral em relação ao grupo discinético sedentário [$F(2,23)=11,23$, $P < 0,05$] (Figura 30).

Figura 30 - Efeitos do tratamento com L-DOPA e exercício físico sobre os prejuízos motores induzidos pela lesão em camundongos C57BL/6.



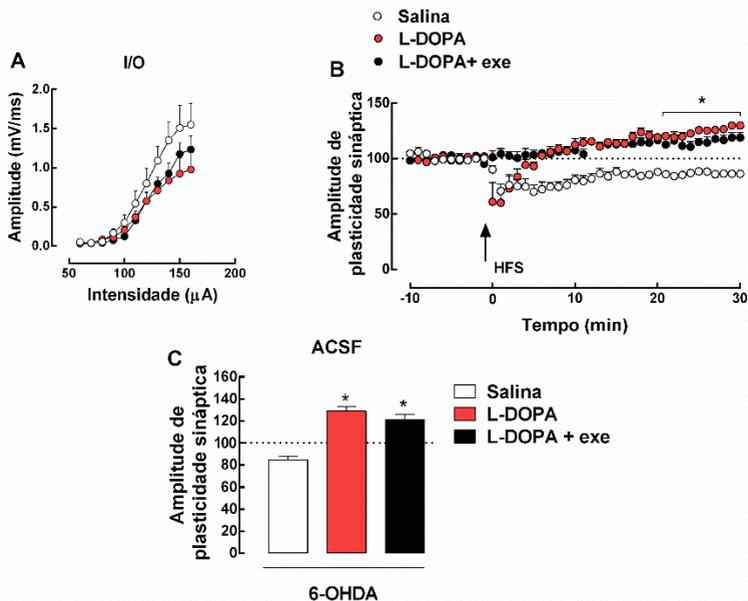
Legenda: Os animais lesionados com 6-OHDA (12 μ g) pertencentes aos grupos sedentário e exercitados foram testados na medida basal, após quatro semanas de cirurgia e ao final do tratamento com L-DOPA (40 minutos após a última administração). Avaliação percentagem viés do uso da pata contralateral dos animais sedentários e exercitados. Os dados representam a média + EPM (n=8/12 por grupo) e foram analisados pela ANOVA com medidas repetidas, seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. *P < 0,05 em relação as medidas basais e # em relação ao sedentário tratado com L-DOPA.

3.12 EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE PARÂMETROS ELETROFISIOLÓGICOS EM FATIAS ESTRIATAIS DE CAMUNDONGOS C57BL/6 DISCINÉTICOS

Primeiramente foi analisada a amplitude máxima de sinal (curva I/O, para maiores detalhes ver a secção 2.7.1) nas fatias estriatais dos animais discinéticos dos grupos sedentário e exercitado, sendo observada uma redução (não significativa) do sinal quando comparado aos animais tratados com salina (Figura 31A). A ANOVA de uma via mostrou que apesar de haver uma pequena diminuição da modificação de plasticidade estriatal em fatias de animais discinéticos exercitados em relação ao grupo sedentário, essa redução também não foi significativa (P > 0,05) (Figura 31 B e C).

A figura 31 apresenta a quantificação de parâmetros eletrofisiológicos no estriado dorsolateral nos animais hemiparkinsonianos tratados com salina e tratados L-DOPA (sedentário) e exercitado (após o protocolo de quatro semanas de exercício físico em esteira, uma semana de habituação e três de treinamento).

Figura 31 – Avaliação de parâmetros eletrofisiológicos córtico-estriatal dorsolateral em camundongos C57BL/6 discinéticos sedentários e exercitados.



Legenda: A avaliação da plasticidade cortico-estriatal dorsolateral em camundongos lesionados com 6-OHDA (12 μ g) foi realizada após 4 semanas de tratamento com L-DOPA/benserazida (25/12,5 mg/hkg) nos grupos sedentário e exercitado. Amplitude máxima de sinal de fatias estriatais de todos os grupos em decorrência do estímulo de intensidade em μ A provocado pelo *Setup* de eletrofisiologia (A). Modificação de plasticidade sináptica basal das fatias em todos os grupos durante 30 minutos após estímulo tetânico de HFS (B). Médias dos últimos 10 minutos de todos os grupos e em relação a porcentagem de plasticidade basal (C). Os resultados foram avaliados pela ANOVA de uma via seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPM. (n=6-12 fatias de 6-12 animais). * $P < 0,05$ comparado a respostas de fatias controle. ACSF, fluido cérebro espinal artificial; exe, exercício; HFS, *high frequency stimulation*; I/O, curva *input e output*.

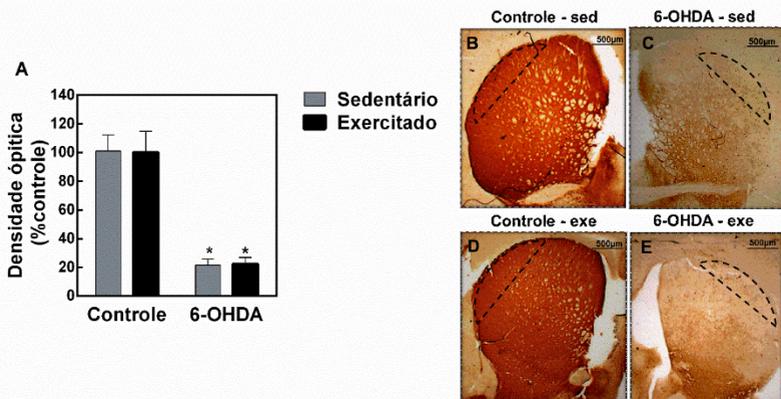
Como ilustrado na Figura 31B, o tratamento crônico com L-DOPA alterou a plasticidade sináptica córtico-estriatal em ambos os grupos (sedentário e exercitado), indicado pela linha temporal que permaneceu durante 30 minutos após aplicação do protocolo de HFS. Essa modificação foi confirmada com a avaliação dos últimos 10 minutos

do protocolo em relação a plasticidade basal com post-hoc de Newman-Keuls [$F(2,24)= 7, P<0,05$]. Já em relação ao grupo discinético sedentário e exercitado houve uma redução, porém não significativa ($P>0,05$) (Figura 31C).

3.13 O EXERCÍCIO FÍSICO NÃO MODIFICA O CONTEÚDO DE TH EM CAMUNDONGOS C57BL/6 DISCINÉTICOS

A Figura 32 ilustra os resultados da imunohistoquímica para TH no estriado dos animais lesionados com 6-OHDA dos grupos sedentário e exercitado, realizada ao final do protocolo experimental para o controle da lesão dopaminérgica. A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do tratamento com 6-OHDA [$F(1,20)= 332,36, P<0,05$], mas não do fator exercício físico [$F(1,20)= 0,012, P>0,05$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls indicou que a injeção intra-estriatal de 6-OHDA em camundongos C57BL/6 foi capaz de diminuir a densidade de TH no estriado em aproximadamente 90% em comparação ao lado controle (não lesionado) ($P<0,05$) (Figura 32). Por outro lado, após quatro semanas do protocolo de exercício físico não houve modificação da degeneração dopaminérgica em comparação ao grupo sedentário.

Figura 32 - Efeitos do exercício físico sobre a degeneração dopaminérgica estriatal induzida pela micro-injeção de 6-OHDA em camundongos C57BL/6.



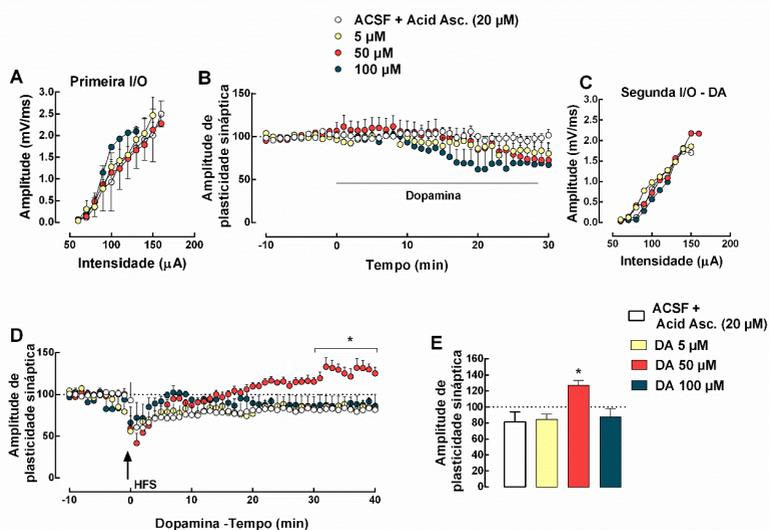
Legenda: Avaliação da densidade óptica do imunocónteuo de TH do lado não lesionado (controle) e lado lesionado (6-OHDA) do grupo sedentário e exercitado. (A). Imagem representativa do lado controle (não lesionado) e lado lesionado (6-OHDA) de ambos os grupos sedentário e exercitado (B-E). Os resultados foram analisados pela ANOVA de duas vias seguido pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPM (n=6 por grupo). *P<0,05 vs. controle. Exe – exercício; Sed – sedentário; 6-OHDA – 6-hidroxidopamina; TH – Tirosina hidroxilase.

3.14 EFEITO DO TRATAMENTO *IN VITRO* COM DOPAMINA SOBRE A PLASTICIDADE EM FATIAS ESTRIATAIS

Inicialmente as fatias estriatais sem adição de DA ou ácido ascórbico, apenas com ACSF, foram testadas em sua amplitude máxima de sinal basal (Primeira I/O, Figura 33A). A ANOVA de uma via mostrou que as fatias inicialmente não diferiram entre si em relação ao sinal máximo (P>0,05). Em seguida, as fatias estriatais foram submetidas a diferentes concentrações de DA (5, 50 e 100 µM) em ácido ascórbico (20 µM) durante 30 minutos em solução de ACSF (Figura 33B). O tratamento com a DA provocou uma ligeira redução de plasticidade sináptica basal, entretanto essa modificação não foi significativa (P>0,05) em comparação com fatia controle e demais concentrações. Em seguida foi realizada uma segunda curva I/O para a verificação de amplitude máxima basal, onde as fatias tratadas com DA (50 µM) apresentaram uma tendência no aumento de amplitude (P=0,057) (Figura 33 C). Após o restabelecimento da nova linha basal (após a segunda curva I/O) as fatias

foram analisadas durante 30 minutos após o estímulo tetânico com o mesmo protocolo de HFS anterior. A concentração de 50 μM de DA promoveu uma facilitação da LTP estriatal [$F(3,20)=24,29$ $P<0,05$] (Figura 33 D). A figura 33E mostra as médias dos últimos 10 minutos do protocolo HFS.

Figura 33 – O tratamento com a dopamina em fatias estriatais altera a plasticidade semelhante ao tratamento crônico com L-DOPA/benserazida.



Legenda: As fatias estriatais foram submetidas a diferentes concentrações de dopamina (5, 50 e 100 μM) em ácido ascórbico (20 μM) durante 30 minutos preparadas em solução de ACSF. A amplitude máxima de sinal de todas as concentrações antes de adicionar dopamina na solução de ACSF (Primeira I/O) (A). Efeitos de diferentes concentrações de dopamina sobre a plasticidade sináptica basal (B). Amplitude máxima de sinal de todas as concentrações de após adicionar dopamina solução de ACSF (Segunda I/O) (C). Amplitude de plasticidade sináptica basal e após o protocolo de HFS das fatias durante 40 minutos em todas as concentrações de dopamina (D). Médias de todas as concentrações de dopamina e as modificações de plasticidade dos últimos 10 minutos em relação a porcentagem de plasticidade basal após o protocolo de HFS (E). Os resultados foram analisados pela ANOVA de uma via seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados representam a média + EPM ($n=6$ fatias = 6 animais). * $P<0,05$ comparado com as demais concentrações. Acid Asc., ácido ascórbico; ACSF, fluido cérebro espinhal artificial; DA, dopamina; exe, exercício; HFS, *high frequency stimulation*; I/O, curva *input e output*.

4 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo fornecem novas evidências de que um programa de exercício físico controlado em esteira pode atenuar as lids assim como atenuar os prejuízos motores em camundongos das linhagens *Swiss* albinos e C57BL/6 previamente lesionados com uma injeção intra-estriatal unilateral de 6-OHDA. Este efeito antidiscinético do exercício físico foi comparável e até superior aquele obtido com a administração aguda da amantadina (60 mg/kg), o antidiscinético usado na prática clínica em pacientes com a DP. O exercício físico aumentou os níveis estriatais de GDNF. Por outro lado, este protocolo de exercício físico em esteira durante 4 semanas promoveu resultados contraditórios quanto ao seu potencial neuroprotetor ou neurorestaurador, sendo capaz de reverter a redução do imunocontéudo de TH no estriado de camundongos *Swiss* albinos lesionados com 6-OHDA, sem, todavia, alterar este marcador em camundongos C57BL/6 hemiparkinsonianos. No entanto, deve ser destacado que os modelos de lesão dos blocos experimentais 2 e 3 diferiram entre si. No bloco experimental 2 os camundongos *Swiss* albinos receberam uma injeção de 6-OHDA (10 µg), enquanto no último bloco experimental os camundongos C57BL/6 receberam duas injeções de 6-OHDA (totalizando 12 µg). Por fim, apesar do exercício físico exercer efeitos antidiscinéticos e melhorar a função dos animais lesionados com 6-OHDA, este não modificou de maneira significativa a plasticidade córtico-estriatal encontrada nos animais discinéticos.

O tratamento da DP é muito complexo devido à natureza progressiva da doença e a um conjunto de sinais e sintomas motores e não motores combinados com efeitos secundários precoces e tardios associados com as intervenções terapêuticas. Embora não existam tratamentos neuroprotetores aprovados para retardar a progressão da doença, algumas terapias paliativas farmacológicas estão disponíveis, assim como alternativas cirúrgicas e outras abordagens não farmacológicas, como por exemplo, o exercício físico e a fisioterapia. Uma vez que o neurotransmissor DA não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), a administração do seu precursor L-DOPA consiste na principal estratégia farmacológica para restabelecer, ao menos temporariamente, a neurotransmissão dopaminérgica e aliviar os sintomas motores dos pacientes (CALNE, 1993; HORSTINK et al., 2006; KIEBURTZ, 2006). O uso clínico da L-DOPA na DP teve início a partir dos anos 1960, e permanece até os dias atuais como a terapia mais eficaz

para atenuar os sintomas motores cardinais da DP (HORSTINK et al., 2006; KIEBURTZ, 2006; RASCOL et al., 2002).

Dessa forma, torna-se relevante o estudo das interações entre a L-DOPA e o exercício físico, uma vez que o exercício físico pode modular a neurotransmissão dopaminérgica. Por exemplo, o exercício físico em roda de correr durante três semanas aumenta a síntese e a liberação de DA em modelo de DP em animais C57BL/6 tratados com uma dose baixa de L-DOPA (5 mg/kg) (ARCHER; FREDRIKSSON, 2010; FREDRIKSSON et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que o exercício físico pode aumentar os níveis de RNAm dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 em neurônios dopaminérgicos no estriado após o exercício físico em esteira durante 30 dias em camundongos tratados com MPTP (FISHER et al., 2004). Outro estudo usando técnicas de neuroimagem em camundongos tratados com MPTP e expostos durante 6 semanas em exercício físico em esteira mostrou aumento na expressão de receptores D2 estriatais nos animais exercitados (VUCKOVIC et al., 2010). Estas adaptações na neurotransmissão dopaminérgica induzidas pelo exercício físico podem estar envolvidas com a redução da fadiga exibida por animais exercitados em comparação a animais sedentários (FOLEY; FLESHNER, 2008). O aumento de RNAm em animais exercitados sugere que estes animais podem ter uma maior capacidade de inibir a ativação da via indireta dos núcleos da base em comparação aos controles sedentários (FOLEY; FLESHNER, 2008; GILLIAM et al., 1984).

Existem poucos estudos clínicos na literatura investigando as possíveis alterações na farmacocinética da L-DOPA induzidas pelo exercício físico, sendo que estes apresentam resultados contraditórios. Por exemplo, um estudo mostrou que em pacientes que receberam administração de L-DOPA 1 hora antes do exercício físico em bicicleta ergométrica (frequência cardíaca alvo foi definida em correlação com a idade de acordo com a fórmula $170 - \text{idade do paciente}$) por duas horas, tiveram a concentração plasmática aumentada de L-DOPA (MUHLACK et al., 2007). Neste sentido, existe a hipótese de que o aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca em resposta ao exercício físico poderia contribuir para um aumento do fluxo sanguíneo mesentérico, resultando em uma maior concentração plasmática de L-DOPA. O exercício físico poderia facilitar a passagem da L-DOPA pela barreira hematoencefálica e, conseqüentemente, reduzir a sua redução nos tecidos periféricos (MUHLACK et al., 2007; MULLER et al., 2006). Por outro lado, outros autores observaram níveis plasmáticos inalterados de L-DOPA em

pacientes parkinsonianos após o exercício físico em bicicleta ergométrica (REUTER et al., 2000).

Alguns pacientes com DP tratados com L-DOPA relatam uma dificuldade em iniciar o exercício físico e o rápido aparecimento de fadiga (PEREZ-LLORET; RASCOL, 2018; VAN HILTEN et al., 1993), embora fosse esperado que o aumento da neurotransmissão dopaminérgica causado pelo exercício físico retardaria o aparecimento da fadiga como demonstrado em modelos animais (FOLEY; FLESHNER, 2008). Os camundongos do protocolo experimentais 2 e 3 treinaram em uma intensidade submáxima (ou moderada). No experimento 2 foram aumentos de intensidade e volume de treino, já o experimento 3 foi aumentada apenas a intensidade. Pela literatura existente, os dois protocolos se mantiveram-se dentro do que é considerada um treino de moderado a submáximo.

Os resultados dos experimentos de avaliação das rotações induzidas por R(-)-apomorfina (0,6 mg/kg. s.c.) e do imunocntéudo de TH no estriado representam importantes indicadores de que a administração intra-estriatal de 6-OHDA induziu de maneira eficaz um estado de hemiparkinsonismo em camundongos das linhagens *Swiss* albinos e C57BL/6. Com relação aos resultados contraditórios observados nas duas linhagens sobre a proteção do exercício físico contra a redução de TH no estriado induzida pela 6-OHDA, deve-se ressaltar que existem discrepâncias na literatura quanto aos efeitos neuroprotetores do exercício físico em modelos de hemiparkinsonismo induzidos pela 6-OHDA e MPTP (PETZINGER et al 2007; TILLERSON et al., 2003).

É importante salientar que essas diferenças encontradas podem ser consequência de diferenças metodológicas como a neurotoxina utilizada, assim como sua dose e a extensão de lesão dopaminérgica. Por exemplo, Petzinger et al. (2007) utilizando camundongos C57BL/6 tratados com MPTP submetidos ao exercício físico intensivo em esteira por 28 dias observaram uma diminuição de DAT e TH no estriado. Em outro trabalho foram utilizados ratos lesionados com 6-OHDA e camundongos lesionados com MPTP que foram submetidos a um protocolo de exercício físico diário duas vezes ao dia por 15 minutos, sendo observados um aumento de TH e metabólitos de dopamina no estriado (TILLERSON et al., 2003). Outro trabalho com modelo de lesão por MPTP intranasal em camundongos C57BL/6, mostrou que 6 semanas de exercício voluntário em rodas correr não protegeu contra a neurodegeneração nigrostriatal ou inibição mitocondrial, sugerindo que

os benefícios do exercício físico para a DP podem não estar diretamente associados a neuroproteção (AGUIAR et al., 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo no teste do cilindro indicaram que é possível mimetizar o modelo nas duas linhagens de camundongos, pela assimetria no apoio das patas, indicativo da acinesia (FRANCARDO et al., 2011; LUNDBLAD et al., 2005). No entanto em virtude do alto escore de LIDs nos dois blocos experimentais (quatro semanas de tratamento com L-DOPA), os animais apresentavam uma maior porcentagem de assimetria das patas. E após os protocolos de exercício controlado em esteira foi possível observar uma diminuição no viés contralateral dos animais exercitados em ambas as linhagens de camundongos. Já foi relatado anteriormente que camundongos C57BL/6 tratados com doses mais baixas de L-DOPA (tratamento escalonado de 2-12 mg/kg) apresentaram um aumento no viés contralateral ao final do tratamento (LUNDBLAD et al., 2004). Foi mostrado também que o exercício em esteira por 4 semanas em ratos lesionados com 6-OHDA (20 µg) diminuiu viés contralateral à lesão (TAJIRI et al., 2010).

Os camundongos *Swiss* albinos hemiparkinsonianos tratados com L-DOPA exercitados apresentaram um aumento no desempenho no teste de exaustão em esteira e uma maior latência para queda no teste do rotarod. Trabalhos prévios demonstram efeitos benéficos do exercício físico moderado em esteira (11m/min) por 4 semanas no desempenho motor de ratos hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA (TAJIRI et al, 2010). Estes resultados corroboram estudos prévios da literatura, como por exemplo, ratos lesionados com 6-OHDA que foram submetidos ao treinamento em esteira por 14 dias apresentaram redução nas rotações contralaterais induzidas por apomorfina (YOON et al., 2007). Além disso, ratos lesionados com 6-OHDA submetidos a um protocolo de treinamento moderado em esteira por 28 dias apresentaram uma redução na assimetria no uso das patas no teste do cilindro. No teste do rotarod observamos uma melhora da coordenação motora dos animais exercitados. Estes resultados estão de acordo com trabalhos prévios que mostraram uma melhora no desempenho no teste do rotarod em camundongos C57BL/6 lesionados com MPTP submetidos ao exercício físico em esteira durante 28-30 dias (PETZINGER et al., 2007; GORTON et al., 2010).

O principal objetivo do presente trabalho foi investigar o possível efeito redutor das discinesias após um programa controlado de exercício físico em esteira em camundongos hemiparkinsonianos, uma vez que resultados prévios do nosso laboratório indicaram que o exercício voluntário em rodas de correr durante 2 semanas reduziu o

desenvolvimento das LIDs e de alterações neuroquímicas no estriado de camundongos lesionados com 6-OHDA (AGUIAR et al., 2013). Os resultados do presente estudo reforçam a hipótese de que o exercício físico pode representar uma boa terapia adjuvante para o tratamento com L-DOPA na DP, sendo capaz de melhorar a função motora dos animais e reduzir as LIDs. Os efeitos do exercício físico em esteira foram inclusive mais pronunciados do que aqueles observados com a administração aguda de amantadina (60 mg/kg, fármaco antidiscinético de uso clínico) em animais sedentários. Por outro lado, não foram observados efeitos antidiscinéticos aditivos ou sinérgicos da associação de exercício físico e administração aguda de amantadina. Entretanto, deve ser destacado que o efeito antidiscinético marcante do exercício “*per se*” pode ter mascarado possíveis efeitos da associação com a amantadina. Portanto, estudos adicionais são necessários para explorar melhor os possíveis benefícios desta associação do exercício físico com a amantadina, por exemplo, a possibilidade da redução das doses de amantadina e, conseqüentemente, redução de efeitos colaterais.

Os resultados dos efeitos antidiscinéticos do exercício físico do presente estudo corroboram os resultados de um estudo clínico relatando uma diminuição das discinesias de pacientes com a DP após tratamento intensivo de reabilitação (2 vezes ao dia) por 4 semanas de fisioterapia, 5 dias por semana (FRAZZITTA et al., 2012a). O protocolo de reabilitação intensa (que consistia em exercícios de treinamento de marcha, equilíbrio e treino em esteira) provocou uma redução de 71% no escore de discinesias, enquanto que os pacientes que realizaram a reabilitação não intensa (apenas uma vez ao dia) tiveram uma redução mais modesta (apenas 8%) no escore de LIDs. Este mesmo grupo mostrou num estudo com duração de 6 meses que este protocolo de reabilitação intensa manteve a melhora do escore de discinesias, assim como, a classificação dos pacientes na escala UPDRS, e na dosagem de L-DOPA durante os 6 meses de avaliação (FRAZZITTA et al., 2012b). Desta forma, existem evidências convergentes de estudos clínicos e experimentais de que o exercício físico pode atuar como um agente modificador da DP (AGUIAR. et al., 2009; MANTRI et al., 2018; MULLER; MUHLACK, 2010; TOY et al., 2014) e antidiscinético (AGUIAR et al., 2013; FRAZZITTA et al., 2012b, 2012a).

Os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos com os efeitos antidiscinéticos do exercício físico permanecem desconhecidos. Entretanto, estudos pré-clínicos indicaram que o exercício físico diminuiu a perda de neurônios dopaminérgicos e alterações na neurotransmissão

dopaminérgica na via nigroestriatal em modelos animais da DP (AGUIAR et al., 2016a; FISHER et al., 2004; KLEMMANN et al., 2017; TOY et al., 2014). Um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa observou que os efeitos antidiscinéticos de exercício físico voluntário foram associados com a normalização da sinalização dopaminérgica, especificamente a hiperfosforilação de DARPP-32 e expressão de c-Fos (AGUIAR et al., 2013) no estriado de camundongos lesionados com 6-OHDA. Em outro estudo recente, foi demonstrado que o exercício físico em esteira durante 4 semanas com intensidade moderada induziu modificações na sinalização de neuropeptídeos e endocanabinoides no estriado (KLEMMANN et al., 2017).

No presente estudo, o tratamento crônico com L-DOPA durante 4 semanas resultou em um aumento no imunocontéudo de DAT no estriado lesionado dos animais sedentários e exercitados. Por outro lado, um estudo prévio mostrou que o exercício físico diminui a expressão de DAT no estriado de camundongos lesionados com MPTP (FISHER et al., 2004). Neste sentido, diversos mecanismos têm sido mostrados para regular a atividade e os níveis de DAT, incluindo: (1) a expressão gênica da proteína e do número de transportador; (2) ativação da fosforilação através de receptores para glutamato, tais como o receptor metabotrópico mGluR5; e (3) internalização em endossomas mediada pela DA (PAGE et al., 2001). Alterações na atividade e níveis de DAT na membrana dos neurônios podem influenciar os níveis de DA na fenda sináptica. Uma intervenção (como exercício físico), que diminui a expressão DAT pode, portanto, resultar em um aumento dos níveis de DA na fenda sináptica. A diminuição da expressão de DAT em animais exercitados também poderia explicar o melhor desempenho motor em comparação ao grupo de animais lesionados não exercitados (FISHER et al., 2004). Estes dados merecem atenção, uma vez que a redução na expressão de DAT pode minimizar os sintomas, contribuindo para o aumento dos níveis de DA na fenda sináptica, que, entretanto, podem levar ao desenvolvimento das discinesias (TROIANO et al., 2009).

Adicionalmente, os resultados pioneiros do presente estudo de que o exercício físico em esteira aumenta os níveis de GDNF no estriado de animais discinéticos fornecem uma nova visão mecanicista. Cohen e colaboradores (COHEN et al., 2003) demonstraram que o exercício forçado de membros pré-lesão pode prevenir os déficits comportamentais e neuroquímicos induzidos pela administração de 6-OHDA, e relacionaram esta proteção do exercício físico ao aumento dos níveis estriatais de GDNF. Evidências obtidas em estudos, tanto *in vivo* quanto

in vitro, indicam o potencial protetor e regenerativo do GDNF sobre neurônios dopaminérgicos (D'ANGLEMONT DE TASSIGNY; PASCUAL; LOPEZ-BARNEO, 2015). O pré-tratamento intra-estriatal com GDNF (100 µg), 4 semanas antes da lesão com 6-OHDA em ratos foi capaz de prevenir a degeneração de neurônios dopaminérgicos (AOI et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que a injeção i.c.v. de GDNF após lesão por 6-OHDA (28 µg) restaura os níveis de TH no estriado dorsolateral de ratos, bem como melhora os sintomas motores destes animais (KIRIK et al., 2001). De grande relevância para o presente estudo, foi demonstrado que a injeção intra-estriatal de GDNF (5 µg) reduziu as LIDs em macacos tratados com MPTP (IRAVANI et al., 2001). Em conjunto, estes resultados indicam que o aumento nos níveis de GDNF no estriado de animais discinéticos pode representar um mecanismo importante do efeito modulador do exercício físico em esteira sobre as LIDs.

Em adição, as diversas alterações neuroquímicas no estriado envolvidas com o desenvolvimento das LIDs acarretam modificações na plasticidade sináptica córtico-estriatal (CALABRESI et al., 2007; MORGANTE et al., 2006). Em modelos animais, o desenvolvimento das LIDs é caracterizado por uma indução irreversível de LTP em neurônios estriatais (PICCONI et al., 2003), muitas vezes chamada de metaplasticidade (GIORDANO et al., 2018). Esse perfil de plasticidade encontrado em animais discinéticos é considerado alterado, uma vez que as conexões sinápticas não sofrem despoteção e, portanto, não retornam aos valores basais (PICCONI et al., 2003). Estudos morfológicos observaram importantes mudanças estruturais no estriado após a indução da neurodegeneração dopaminérgica e consequente alteração da plasticidade sináptica, incluindo a redução do número, forma e tamanho das espinhas dendríticas (HIGLEY; SABATINI, 2010).

Em relação a plasticidade córtico-estriatal, observou-se inicialmente que o modelo de lesão com 6-OHDA realizado nesta tese (experimento3) não altera a LTD após o protocolo de HFS. Esse resultado corrobora com resultados descritos previamente em animais com lesão parcial da via nigro-estriatal (CALABRESI; CENTONZE; BERNARDI, 2000). Para indução da plasticidade do tipo LTD, é fundamental um equilíbrio entre as neurotransmissões dopaminérgica e colinérgica no estriado (GIORDANO et al., 2018). Interneurônios colinérgicos de grande porte possuem um papel integrador essencial dentro do circuito neuronal intrínseco em que operam e a acetilcolina endógena regula as concentrações sinápticas de DA no estriado através dos receptores

nicotínicos pré-sinápticos (CALABRESI et al., 2000a). Por exemplo, a falta de inervação dopaminérgica provoca a perda de LTP e LTD córtico-estriatal (CALABRESI et al., 2007), sugerindo que um nível baixo, embora crítico, de neurônio dopaminérgicos são necessários para essa forma de plasticidade (PAILLE et al., 2010).

No entanto, algumas evidências sugerem uma incapacidade de reversão da LTP no estriado de animais discinéticos (CALABRESI et al., 2000b; CENTONZE et al., 1999; KERR; WICKENS, 2001). Uma explicação possível para esta alteração na plasticidade estriatal observada em animais discinéticos é o grande aumento do sítio Thr34 da proteína DARPP-32 [Thr34], um inibidor da proteína fosfatase 1 (PICCONI et al., 2003). A ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D1 no estriado estimula a produção de catalisadores da fosforilação de DARPP-32 em Thr34, que por sua vez converte a DARPP-32 em um potente inibidor da proteína fosfatase 1. Como demonstrado anteriormente pelo nosso grupo, o exercício em roda de correr pode diminuir a DARPP-32 fosforilada em animais C57BL/6 discinéticos (AGUIAR et al., 2013). Essa é uma possível hipótese de que o exercício físico poderia modificar a plasticidade estriatal frequentemente encontrada em modelos animais de LIDs, no entanto esse efeito do exercício físico não foi observado no presente estudo.

Outro mecanismo frequentemente implicado no desenvolvimento das LIDs é o aumento da expressão do gene cFos (ANDERSSON; HILBERTSON; CENCI, 1999) e da liberação de DA por neurônios serotoninérgicos (CARTA et al., 2007). Outro estudo mostrou um aumento de discinesias devido a inibição de cdk5 em camundongos (AGUIAR et al., 2013). A Cdk5 é uma proteína cinase constitutivamente ativa, que mantém o sistema basal ou homeostático estado de fosforilação de muitas proteínas pré- e pós-sináptica. Essa redução de cdK5 após o exercício físico também foi observada anteriormente pelo nosso grupo (AGUIAR et al., 2013), representando um outro mecanismo de modificação de plasticidade de animais discinéticos exercitados, em comparação com os discinéticos sedentários (HERNANDEZ et al., 2016). Já foi demonstrado anteriormente o papel da Cdk5 na LTP córtico-estriatal. A atenuação farmacológica de Cdk5 ou em animais transgênicos causou diminuição de LTP facilitada pela DA, ou mesmo em LTD sem afetar a conectividade sináptica córtico-estriatal. Um trabalho recente mostrou que a aprendizagem motora no rotarod pode causar mudanças na plasticidade sináptica córtico-estriatal (GIORDANO et al., 2018). Essa pode ser uma possível explicação para a ausência de

alterações na plasticidade córtico-estriatal observada no presente estudo entre animais discinéticos sedentários e exercitados.

Por fim, o tratamento das fatias estriatais com dopamina (50 μ M) induziu o mesmo padrão de plasticidade sináptica encontrado nos animais tratados cronicamente com L-DOPA. Essa concentração é semelhante a encontrada em ratos não lesionados tratados com L-DOPA (25-50 μ M) em estudos de microdiálise (ABERCROMBIE; BONATZ; ZIGMOND, 1990). Trabalhos anteriores mostraram que a administração crônica de L-DOPA promove um menor aumento nos níveis estriatais de DA em ratos lesionados com 6-OHDA (HEFTI; MELAMED; WURTMAN, 1981; LLOYD; DAVIDSON; HORNYKIEWICZ, 1975). Corroborando os nossos achados, foi demonstrado previamente que a DA na concentração de 10 μ M pode aumentar a amplitude de LTP em fatias córtico-estriatais (HERNANDEZ et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os presentes achados fornecem a primeira evidência de que o exercício físico controlado em esteira atenua as LIDs em camundongos Swiss albinos e C57BL6 lesionados com 6-OHDA. Embora permaneçam controversos os possíveis efeitos neuroprotetores do exercício físico sobre a lesão dopaminérgica induzida pela 6-OHDA, os resultados deste estudo indicam que os efeitos antidiscinéticos do exercício físico em esteira podem ser associados, ao menos em parte, a um aumento nos níveis de GDNF no estriado. Essa primeira parte foi publicada na revista *Molecular Neurobiology*. Além disso, foi mostrada pela primeira vez a DA induz alterações de plasticidade estriatal semelhantes aquelas observadas nos animais discinéticos submetidos ao tratamento crônico com L-DOPA e exercício físico. Entretanto, o exercício físico não foi capaz de modificar a plasticidade cortico-estriatal encontrada nos animais discinéticos. Como perspectiva, estudos adicionais são necessários para confirmar o envolvimento de mecanismos neuroprotetores e modificações na plasticidade córtico-estriatal nos efeitos do exercício físico sobre a modulação das LIDs.

REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, E. D.; BONATZ, A. E.; ZIGMOND, M. J. Effects of L-dopa on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine-treated rats. **Brain research**, v. 525, n. 1, p. 36–44, ago. 1990.

ABRAHAM, W. C.; BEAR, M. F. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. **Trends in neurosciences**, v. 19, n. 4, p. 126–130, abr. 1996.

AGUIAR, A. S.; PREDIGER, R. D. S. **Frontiers in Parkinson's Disease Research**. Nova Science Publishers, 2012.

AGUIAR, A. S. et al. Exercise attenuates levodopa-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine-lesioned mice. **Neuroscience**, v. 243, p. 46–53, 2013.

AGUIAR, A. S. et al. Six weeks of voluntary exercise don't protect C57BL/6 mice against neurotoxicity of MPTP and MPP+. **Neurotoxicity Research**, v. 25, n. 2, p. 147–152, 2014.

AGUIAR, A. S. et al. Exercise Improves Cognitive Impairment and Dopamine Metabolism in MPTP-Treated Mice. **Neurotoxicity Research**, v. 29, n. 1, p. 118–125, 2016a.

AGUIAR, A. S. J. et al. Moderate-Intensity Physical Exercise Protects Against Experimental 6-Hydroxydopamine-Induced Hemiparkinsonism Through Nrf2-Antioxidant Response Element Pathway. **Neurochemical research**, v. 41, n. 1–2, p. 64–72, fev. 2016b.

AGUIAR, A. S. J. et al. The exercise sex gap and the impact of the estrous cycle on exercise performance in mice. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 10742, jul. 2018.

AGUIAR., A. S. et al. Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. **Journal of Neural Transmission**, v. 115, n. 9, 2008.

AGUIAR., A. S. et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, 2009.

AHLSKOG, J. E.; MUENTER, M. D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 16, n. 3, p. 448–458, maio 2001.

AIRAKSINEN, M. S.; TITIEVSKY, A.; SAARMA, M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? **Molecular and cellular neurosciences**, v. 13, n. 5, p. 313–325, maio 1999.

AKERUD, P. et al. Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult substantia nigra dopaminergic neurons. **Journal of neurochemistry**, v. 73, n. 1, p. 70–78, jul. 1999.

AKERUD, P. et al. Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 21, n. 20, p. 8108–8118, 2001.

AL-JARRAH, M. et al. Endurance exercise training promotes angiogenesis in the brain of chronic/progressive mouse model of Parkinson's Disease. **NeuroRehabilitation**, v. 26, n. 4, p. 369–373, 2010.

ALEXANDER, G. E.; CRUTCHER, M. D.; DELONG, M. R. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, “prefrontal” and “limbic” functions. **Progress in brain research**, v. 85, p. 119–146, 1990.

ALLEN, N. E. et al. The effects of an exercise program on fall risk factors in people with Parkinson's disease: a randomized controlled trial. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 25, n. 9, p. 1217–1225, jul. 2010.

AMANO, S. et al. The effect of Tai Chi exercise on gait initiation and gait performance in persons with Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 19, n. 11, p. 955–960, nov. 2013.

AMBANI, L. M.; VAN WOERT, M. H. Start hesitation--a side effect of long-term levodopa therapy. **The New England journal of medicine**, v. 288, n. 21, p. 1113–1115, maio 1973.

ANDERSSON, M.; HILBERTSON, A.; CENCI, M. A. Striatal fosB expression is causally linked with l-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of disease**, v. 6, n. 6, p. 461–474, dez. 1999.

ANGLADE, P. et al. Synaptic plasticity in the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. **Neurodegeneration: a journal for neurodegenerative disorders, neuroprotection, and neuroregeneration**, v. 5, n. 2, p. 121–128, jun. 1996.

AOI, M. et al. The effect of intrastriatal single injection of GDNF on the nigrostriatal dopaminergic system in hemiparkinsonian rats: behavioral and histological studies using two different dosages. **Neuroscience research**, v. 36, n. 4, p. 319–325, abr. 2000.

ARCHER, T.; FREDRIKSSON, A. Physical exercise attenuates MPTP-induced deficits in mice. **Neurotoxicity research**, v. 18, n. 3–4, p. 313–327, nov. 2010.

BARBEAU, A. L-dopa therapy in Parkinson's disease: a critical review of nine years' experience. **Canadian Medical Association journal**, v. 101, n. 13, p. 59–68, dez. 1969.

BARD, G. PARKINSONISM. EVALUATION AND TREATMENT OF MOVEMENT DISORDERS. **California medicine**, v. 101, p. 253–256, out. 1964.

BARGIOTAS, P.; KONITSIOTIS, S. Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: emerging treatments. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 9, p. 1605–1617, 2013.

BASTIDE, M. F. et al. Progress in Neurobiology Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 132, p. 96–168, 2015.

BATCHELOR, P. E. et al. Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum. **The European journal of neuroscience**, v. 12, n. 10, p. 3462–3468, out. 2000.

BERG, D. et al. AFQ056 treatment of levodopa-induced dyskinesias: results of 2 randomized controlled trials. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 26, n. 7, p. 1243–1250, jun. 2011.

BERGEN, J. L. et al. Aerobic exercise intervention improves aerobic capacity and movement initiation in Parkinson's disease patients. **NeuroRehabilitation**, v. 17, n. 2, p. 161–168, 2002.

BERNHEIMER, H. et al. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. **Journal of the neurological sciences**, v. 20, n. 4, p. 415–455, dez. 1973.

BETARBET, R. et al. Differential expression and ser897 phosphorylation of striatal N-methyl-d-aspartate receptor subunit NR1 in animal models of Parkinson's disease. **Experimental neurology**, v. 187, n. 1, p. 76–85, maio 2004.

BEZARD, E. et al. Adaptive changes in the nigrostriatal pathway in response to increased 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration in the mouse. **The European journal of neuroscience**, v. 12, n. 8, p. 2892–2900, ago. 2000.

BIRKMAYER, W.; HORNYKIEWICZ, O. [The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia]. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 73, p. 787–788, nov. 1961.

BLACK, J. E. et al. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 14, p. 5568–5572, jul. 1990.

BLANCHET, P. J.; KONITSIOTIS, S.; CHASE, T. N. Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys.

Movement Disorders, v. 13, n. 5, p. 798–802, 1998.

BLANDINI, F. et al. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, v. 62, n. 1, p. 63–88, set. 2000.

BORGOHAIN, R. et al. Randomized trial of safinamide add-on to levodopa in Parkinson's disease with motor fluctuations. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 29, n. 2, p. 229–237, fev. 2014.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, v. 24, n. 2, p. 197–211, 2003.

BROWN, L. L.; SHARP, F. R. Metabolic mapping of rat striatum: somatotopic organization of sensorimotor activity. **Brain research**, v. 686, n. 2, p. 207–222, jul. 1995.

CALABRESI, P. et al. Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. **The European journal of neuroscience**, v. 4, n. 10, p. 929–935, 1992.

CALABRESI, P. et al. Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. **Trends in neurosciences**, v. 23, n. 3, p. 120–126, mar. 2000a.

CALABRESI, P. et al. Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 22, p. 8443–8451, nov. 2000b.

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

CALABRESI, P. et al. Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: Filling the bench-to-bedside gap. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 11, p. 1106–1117, 2010.

CALABRESI, P. et al. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a

critical reappraisal. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 1022–1030, 2014.

CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G. Electrophysiology of dopamine in normal and denervated striatal neurons. **Trends in neurosciences**, v. 23, n. 10 Suppl, p. S57-63, out. 2000.

CALNE, D. B. Treatment of Parkinson's disease. **The New England journal of medicine**, v. 329, n. 14, p. 1021–1027, set. 1993.

CAO, J. P. et al. Expressions and possible roles of GDNF receptors in the developing dopaminergic neurons. **Brain research bulletin**, v. 83, n. 6, p. 321–330, nov. 2010.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature**, v. 180, n. 4596, p. 1200, nov. 1957.

CARTA, M. et al. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. **Brain**, v. 130, n. 7, p. 1819–1833, 2007.

CARTA, M.; BEZARD, E. Contribution of pre-synaptic mechanisms to l-DOPA-induced dyskinesia. **Neuroscience**, v. 198, p. 245–251, 2011.

CEDARBAUM, J. M. et al. Effect of supplemental carbidopa on bioavailability of L-dopa. **Clinical neuropharmacology**, v. 9, n. 2, p. 153–159, 1986.

CENTONZE, D. et al. Unilateral dopamine denervation blocks corticostriatal LTP. **Journal of neurophysiology**, v. 82, n. 6, p. 3575–3579, dez. 1999.

CHASE, T. N.; OH, J. D. Striatal mechanisms and pathogenesis of parkinsonian signs and motor complications. **Annals of neurology**, v. 47, n. 4 Suppl 1, p. S122–9; discussion S129–30, 2000.

CHEN, H. et al. Physical activity and the risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 64, n. 4, p. 664–669, fev. 2005.

COHEN, A. D. et al. Neuroprotective effects of prior limb use in 6-hydroxydopamine-treated rats: possible role of GDNF. **Journal of neurochemistry**, v. 85, n. 2, p. 299–305, abr. 2003. .

COMELLA, C. L. et al. Physical therapy and Parkinson's disease: a controlled clinical trial. **Neurology**, v. 44, n. 3 Pt 1, p. 376–378, mar. 1994.

CONNOLLY, B. S.; LANG, A. E. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. **JAMA**, v. 311, n. 16, p. 1670–1683, abr. 2014.

CORDOVA, F. M. et al. In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motor function. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

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

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C.; CHRISTIE, L.-A. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. **Trends in neurosciences**, v. 30, n. 9, p. 464–472, set. 2007.

COTZIAS, G. C. L-Dopa for Parkinsonism. **The New England journal of medicine**, v. 278, n. 11, p. 630, mar. 1968.

CROSBY, N.; DEANE, K.; CLARKE, C. Amantadine for dyskinesia in Parkinson's disease (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2003.

DA CONCEIÇÃO, F. S. L. et al. Murine Model for Parkinson's Disease: from 6-OH Dopamine Lesion to Behavioral Test. **Journal of Visualized Experiments**, n. 35, p. 9–11, 2010.

D'ANGLEMONT DE TASSIGNY, X.; PASCUAL, A.; LOPEZ-BARNEO, J. GDNF-based therapies, GDNF-producing interneurons, and trophic support of the dopaminergic nigrostriatal pathway. Implications for Parkinson's disease. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 9, p. 10, 2015.

DAY, M. et al. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 251–259, fev. 2006.

DE GOEDE, C. J. et al. The effects of physical therapy in Parkinson's disease: a research synthesis. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 82, n. 4, p. 509–515, abr. 2001.

DEL-BEL, E. et al. Counteraction by nitric oxide synthase inhibitor of neurochemical alterations of dopaminergic system in 6-OHDA-lesioned rats under L-DOPA treatment. **Neurotoxicity Research**, v. 25, n. 1, p. 33–44, 2014.

DEL-BEL, E. et al. Nitric oxide, a new player in L-DOPA-induced dyskinesia? **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 7, p. 168–192, jan. 2015.

DIXON, L. et al. Occupational therapy for patients with Parkinson's disease. **The Cochrane database of systematic reviews**, n. 3, p. CD002813, jul. 2007.

DUNAH, A. W. et al. Alterations in subunit expression, composition, and phosphorylation of striatal N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Molecular pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 342–352, fev. 2000.

DUNNETT, S. **L-DOPA, dyskinesia and striatal plasticity.** **Nature neuroscience** United States, maio 2003.

DUVOISIN, R. C. A REVIEW OF DRUG THERAPY IN PARKINSONISM. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 41, p. 898–910, ago. 1965.

EGGERT, K. et al. Safety and efficacy of perampanel in advanced Parkinson's disease: a randomized, placebo-controlled study. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 25, n. 7, p. 896–905, maio 2010.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. Verteilung Von Noradrenalin Und Dopamin (3-Hydroxytyramin) Im Gehirn Des Menschen Und Ihr

Verhalten Bei Erkrankungen Des Extrapiramidalen Systems. **Klinische Wochenschrift**, v. 38, n. 24, p. 1236–1239, 1960.

FAHN, S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. **Annals of neurology**, v. 47, n. 4 Suppl 1, p. S2- 9; discussion S9-11, abr. 2000.

FAHN, S. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 30, n. 1, p. 4–18, jan. 2015b.

FEYDER, M.; BONITO-OLIVA, A.; FISONE, G. L-DOPA-Induced Dyskinesia and Abnormal Signaling in Striatal Medium Spiny Neurons: Focus on Dopamine D1 Receptor-Mediated Transmission. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 5, p. 71, 2011.

FISHER, B. E. et al. Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse basal ganglia. **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, n. 3, p. 378–390, 2004.

FOLEY, T. E.; FLESHNER, M. Neuroplasticity of dopamine circuits after exercise: implications for central fatigue. **Neuromolecular medicine**, v. 10, n. 2, p. 67–80, 2008.

FOX, S. H. et al. The Movement Disorder Society Evidence-Based Medicine Review Update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 26 Suppl 3, p. S2-41, out. 2011.

FRANCARDO, V. et al. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 42, n. 3, p. 327–340, 2011.

FRAZZITTA, G. et al. Rehabilitation improves dyskinesias in Parkinsonian patients: A pilot study comparing two different rehabilitative treatments. **NeuroRehabilitation**, v. 30, n. 4, p. 295–301, 2012a.

FRAZZITTA, G. et al. Intensive rehabilitation treatment in parkinsonian

patients with dyskinesias: A preliminary study with 6-month followup. **Parkinson's Disease**, v. 2012, p. 4–7, 2012b.

FREDRIKSSON, A. et al. Running wheel activity restores MPTP-induced functional deficits. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 118, n. 3, p. 407–420, mar. 2011.

GARDONI, F. et al. A critical interaction between NR2B and MAGUK in L-DOPA induced dyskinesia. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 11, p. 2914–2922, mar. 2006.

GAUTHIER, L.; DALZIEL, S.; GAUTHIER, S. The benefits of group occupational therapy for patients with Parkinson's disease. **The American journal of occupational therapy : official publication of the American Occupational Therapy Association**, v. 41, n. 6, p. 360–365, jun. 1987.

GHIGLIERI, V. et al. Corticostriatal Plastic Changes in Experimental L-DOPA-Induced Dyskinesia. **Parkinson's disease**, v. 2012, p. 358176, 2012.

GHIGLIERI, V. et al. Modulation of serotonergic transmission by eltoprazine in L-DOPA-induced dyskinesia: Behavioral, molecular, and synaptic mechanisms. **Neurobiology of Disease**, v. 86, p. 140–153, 2016.

GILLIAM, P. E. et al. The effects of exercise training on [3H]-spiperone binding in rat striatum. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 20, n. 6, p. 863–867, jun. 1984.

GIORDANO, N. et al. Motor learning and metaplasticity in striatal neurons: relevance for Parkinson's disease. **Brain : a journal of neurology**, v. 141, n. 2, p. 505–520, fev. 2018.

GOETZ, C. G. Charcot on Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 1, n. 1, p. 27–32, 1986.

GOETZ, C. G. et al. Blood levodopa levels and unified Parkinson's disease rating scale function: with and without exercise. **Neurology**, v. 43, n. 5, p. 1040–1042, maio 1993.

GOETZ, C. G. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 1, p. a008862, set. 2011.

GONZALEZ-APARICIO, R.; FLORES, J. A.; FERNANDEZ-ESPEJO, E. Antiparkinsonian trophic action of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor β 1 is enhanced after co-infusion in rats. **Experimental neurology**, v. 226, n. 1, p. 136–147, 2010.

GORTON, L. M. et al. Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse. **Behavioural brain research**, v. 213, n. 2, p. 253–262, dez. 2010.

GRAYBIEL, A. M. Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annual review of neuroscience*, v. 31, p. 359–387, 2008.

GRAZINA, R.; MASSANO, J. Physical exercise and Parkinson's disease: influence on symptoms, disease course and prevention. **Reviews in the neurosciences**, v. 24, n. 2, p. 139–152, 2013.

GROENEWEGEN, H. J. The basal ganglia and motor control. *Neural plasticity*, v. 10, n. 1–2, p. 107–120, 2003.

HALLIWELL, B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? **Acta neurologica Scandinavica. Supplementum**, v. 126, p. 23–33, 1989.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609–1623, nov. 1992.

HARIZ, M. I.; HARIZ, G.-M. Therapeutic stimulation versus ablation. **Handbook of clinical neurology**, v. 116, p. 63–71, 2013.

HASS, C. J.; COLLINS, M. A.; JUNCOS, J. L. Resistance training with creatine monohydrate improves upper-body strength in patients with Parkinson disease: a randomized trial. **Neurorehabilitation and neural repair**, v. 21, n. 2, p. 107–115, 2007.

HAUSER, R. A. et al. Safety and tolerability of pramipexole, a new partial dopamine agonist, in a randomized, controlled study of patients with advanced Parkinson's disease. **European neurology**, v. 62, n. 1, p. 40–48, 2009.

HAUSER, R. A. et al. Pramipexole in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations: a phase 2, double-blind, randomised trial. **The Lancet. Neurology**, v. 10, n. 3, p. 221–229, mar. 2011.

HEFTI, F.; MELAMED, E.; WURTMAN, R. J. The site of dopamine formation in rat striatum after L-dopa administration. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 217, n. 1, p. 189–197, abr. 1981.

HERNANDEZ, A. et al. Cdk5 Modulates Long-Term Synaptic Plasticity and Motor Learning in Dorsolateral Striatum. **Scientific reports**, v. 6, p. 29812, jul. 2016.

HIGLEY, M. J.; SABATINI, B. L. Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. **Nature neuroscience**, v. 13, n. 8, p. 958–966, ago. 2010.

HIRSCH, E.; GRAYBIEL, A. M.; AGID, Y. A. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. **Nature**, v. 334, n. 6180, p. 345–348, jul. 1988.

HIRSCH, M. A. et al. The effects of balance training and high-intensity resistance training on persons with idiopathic Parkinson's disease. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 84, n. 8, p. 1109–1117, ago. 2003.

HOLLOWAY, R. G. et al. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial. **Archives of neurology**, v. 61, n. 7, p. 1044–1053, jul. 2004.

HOLSCHNEIDER, D. P. et al. Functional brain mapping in freely moving rats during treadmill walking. **Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 23, n. 8, p. 925–932, ago. 2003.

- HORNYKIEWICZ, O. The metabolism of brain dopamine in human parkinsonism. **Rivista di patologia nervosa e mentale**, v. 91, n. 5, p. 281–286, out. 1970.
- HORNYKIEWICZ, O. The mechanisms of action of L-dopa in Parkinson's disease. **Life sciences**, v. 15, n. 7, p. 1249–1259, out. 1974.
- HORNYKIEWICZ, O. A brief history of levodopa. **Journal of neurology**, v. 257, n. Suppl 2, p. S249-52, nov. 2010.
- HORSTINK, M. et al. Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies (EFNS) and the Movement Disorder Society-European Section (MDS-ES). Part II: late (complicated) Parkinson's disease. **European journal of neurology**, v. 13, n. 11, p. 1186–1202, nov. 2006.
- HSUEH, S.-C. et al. Voluntary Physical Exercise Improves Subsequent Motor and Cognitive Impairments in a Rat Model of Parkinson's Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, fev. 2018.
- HUOT, P. et al. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Pharmacological reviews**, v. 65, n. 1, p. 171–222, jan. 2013.
- HURELBRINK, C. B.; BARKER, R. A. The potential of GDNF as a treatment for Parkinson's disease. **Experimental neurology**, v. 185, n. 1, p. 1–6, jan. 2004.
- IANCU, R. et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural brain research**, v. 162, n. 1, p. 1–10, jul. 2005.
- IRAVANI, M. M. et al. GDNF reverses priming for dyskinesia in MPTP-treated, L-DOPA-primed common marmosets. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 597–608, 2001.
- ISAACSON, S. H. et al. Parkinson's Patients with Dyskinesia Switched from Immediate Release Amantadine to Open-label ADS-5102. **Movement disorders clinical practice**, v. 5, n. 2, p. 183–190, 2018.

JANG, Y. et al. Modulation of mitochondrial phenotypes by endurance exercise contributes to neuroprotection against a MPTP-induced animal model of PD. **Life sciences**, v. 209, p. 455–465, set. 2018.

JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 665–677, set. 2008.

JIANG, C. et al. Dopaminergic properties and experimental anti-parkinsonian effects of IPX750 in rodent models of Parkinson disease. **Clinical neuropharmacology**, v. 27, n. 2, p. 63–73, 2004.

KERR, J. N.; WICKENS, J. R. Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro. **Journal of neurophysiology**, v. 85, n. 1, p. 117–124, jan. 2001.

KIEBURTZ, K. Issues in neuroprotection clinical trials in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 66, n. 10 Suppl 4, p. S50-7, maio 2006.

KIRIK, D. et al. Delayed infusion of GDNF promotes recovery of motor function in the partial lesion model of Parkinson's disease. **The European journal of neuroscience**, v. 13, n. 8, p. 1589–1599, abr. 2001.

KLANN, E. Thwarting dyskinesia by targeting mTORC1. **Science signaling**, v. 2, n. 80, p. pe42, jul. 2009.

KLEMMANN, C. J. H. M. et al. Physical Exercise Modulates L-DOPA-Regulated Molecular Pathways in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. **Molecular neurobiology**, out. 2017.

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

KUCZENSKI, R. Differential effects of reserpine and tetrabenazine on rat striatal synaptosomal dopamine biosynthesis and synaptosomal dopamine pools. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 201, n. 2, p. 357–367, maio 1977.

LAU, Y.-S. et al. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. **The European journal of neuroscience**, v. 33, n. 7,

p. 1264–1274, abr. 2011.

LEES, A. J. Comparison of therapeutic effects and mortality data of levodopa and levodopa combined with selegiline in patients with early, mild Parkinson's disease. Parkinson's Disease Research Group of the United Kingdom. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 311, n. 7020, p. 1602–1607, dez. 1995.

LEWITT, P. A. et al. Randomized clinical trial of fipamezole for dyskinesia in Parkinson disease (FJORD study). **Neurology**, v. 79, n. 2, p. 163–169, jul. 2012.

LLOYD, K. G.; DAVIDSON, L.; HORNYKIEWICZ, O. The neurochemistry of Parkinson's disease: effect of L-dopa therapy. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 195, n. 3, p. 453–464, dez. 1975.

LOTIA, M.; JANKOVIC, J. **New and Emerging Medical Therapies in Parkinson's Disease**. [s.l: s.n.]. v. 6566

LUGINGER, E. et al. Beneficial effects of amantadine on L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 15, n. 5, p. 873–878, 2000.

LUNDBLAD, M. et al. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: Relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiology of Disease**, v. 16, n. 1, p. 110–123, 2004.

LUNDBLAD, M. et al. Pharmacological validation of a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia. **Experimental Neurology**, v. 194, n. 1, p. 66–75, 2005.

MABANDLA, M. et al. Voluntary running provides neuroprotection in rats after 6-hydroxydopamine injection into the medial forebrain bundle. **Metabolic brain disease**, v. 19, n. 1–2, p. 43–50, jun. 2004.

MABANDLA, M. V.; RUSSELL, V. A. Voluntary exercise reduces the neurotoxic effects of 6-hydroxydopamine in maternally separated rats.

Behavioural brain research, v. 211, n. 1, p. 16–22, jul. 2010.

MAIER HOEHN, M. M. Parkinsonism treated with levodopa: progression and mortality. **Journal of neural transmission. Supplementum**, v. 19, p. 253–264, 1983.

MANSON, A. J.; IAKOVIDOU, E.; LEES, A. J. Idazoxan is ineffective for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 15, n. 2, p. 336–337, mar. 2000.

MANTRI, S. et al. Physical Activity in Early Parkinson Disease. **Journal of Parkinson's disease**, v. 8, n. 1, p. 107–111, 2018.

MARCHESE, R. et al. The role of sensory cues in the rehabilitation of parkinsonian patients: a comparison of two physical therapy protocols. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 15, n. 5, p. 879–883, set. 2000.

MARKOWITZ, J. E. et al. The Striatum Organizes 3D Behavior via Moment-to-Moment Action Selection. *Cell*, v. 174, n. 1, p. 44–58.e17, jun. 2018.

MAVROMMATI, F. et al. Exercise response in Parkinson's disease: insights from a cross-sectional comparison with sedentary controls and a per-protocol analysis of a randomised controlled trial. **BMJ open**, v. 7, n. 12, p. e017194, dez. 2017.

MECO, G. et al. Aripiprazole in L-dopa-induced dyskinesias: a one-year open-label pilot study. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 116, n. 7, p. 881–884, jul. 2009.

MIRELMAN, A. et al. Virtual reality for gait training: can it induce motor learning to enhance complex walking and reduce fall risk in patients with Parkinson's disease? **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 66, n. 2, p. 234–240, fev. 2011.

MIRELMAN, A. et al. Addition of a non-immersive virtual reality component to treadmill training to reduce fall risk in older adults (V-TIME): a randomised controlled trial. **Lancet (London, England)**, v.

388, n. 10050, p. 1170–1182, set. 2016.

MIYAI, I. et al. Treadmill training with body weight support: its effect on Parkinson's disease. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 81, n. 7, p. 849–852, jul. 2000.

MIYAI, I. et al. Long-term effect of body weight-supported treadmill training in Parkinson's disease: a randomized controlled trial. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 83, n. 10, p. 1370–1373, out. 2002.

MIZUNO, Y. et al. Clinical efficacy of istradefylline (KW-6002) in Parkinson's disease: a randomized, controlled study. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 25, n. 10, p. 1437–1443, jul. 2010.

MORGANTE, F. et al. Motor cortex plasticity in Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesias. **Brain : a journal of neurology**, v. 129, n. Pt 4, p. 1059–1069, abr. 2006.

MOSKOVITZ, C.; MOSES, H. 3RD; KLAWANS, H. L. Levodopa-induced psychosis: a kindling phenomenon. **The American journal of psychiatry**, v. 135, n. 6, p. 669–675, jun. 1978.

MUHLACK, S. et al. Exercise improves efficacy of levodopa in patients with Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 22, n. 3, p. 427–430, fev. 2007.

MULLER, T. et al. Impact of gastric emptying on levodopa pharmacokinetics in Parkinson disease patients. **Clinical neuropharmacology**, v. 29, n. 2, p. 61–67, 2006.

MULLER, T.; MUHLACK, S. Effect of exercise on reactivity and motor behaviour in patients with Parkinson's disease. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 81, n. 7, p. 747–753, jul. 2010.

NEEPER, S. A. et al. Physical activity increases mRNA for brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain. **Brain research**, v. 726, n. 1–2, p. 49–56, jul. 1996.

NEGRE-PAGES, L. et al. Anxious and depressive symptoms in Parkinson's disease: the French cross-sectional DoPaMIP study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, v. 25, n. 2, p. 157–166, jan. 2010.

NIEUWBOER, A. et al. The effect of a home physiotherapy program for persons with Parkinson's disease. **Journal of rehabilitation medicine**, v. 33, n. 6, p. 266–272, nov. 2001.

OGONOVSKY, H. et al. The effects of moderate-, strenuous- and over-training on oxidative stress markers, DNA repair, and memory, in rat brain. **Neurochemistry international**, v. 46, n. 8, p. 635–640, jun. 2005.

OLANOW, C. W. et al. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 19, n. 9, p. 997–1005, set. 2004.

ORY-MAGNE, F. et al. Withdrawing amantadine in dyskinetic patients with Parkinson disease: the AMANDYSK trial. **Neurology**, v. 82, n. 4, p. 300–307, jan. 2014.

PAGE, G. et al. Modulation of the neuronal dopamine transporter activity by the metabotropic glutamate receptor mGluR5 in rat striatal synaptosomes through phosphorylation mediated processes. **Journal of neurochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1282–1290, mar. 2001.

PAILLE, V. et al. Distinct levels of dopamine denervation differentially alter striatal synaptic plasticity and NMDA receptor subunit composition. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 42, p. 14182–14193, out. 2010.

PALMER, J. L. et al. Unified Parkinson's Disease Rating Scale-Motor Exam: inter-rater reliability of advanced practice nurse and neurologist assessments. **Journal of advanced nursing**, v. 66, n. 6, p. 1382–1387, jun. 2010.

PALMER, S. S. et al. Exercise therapy for Parkinson's disease. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 67, n. 10, p. 741–745, out. 1986.

PANG, M. Y. C.; MAK, M. K. Y. Trunk muscle strength, but not trunk rigidity, is independently associated with bone mineral density of the lumbar spine in patients with Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 24, n. 8, p. 1176–1182, jun. 2009.

PAPAVASILIOU, P. S. et al. Levodopa in Parkinsonism: potentiation of central effects with a peripheral inhibitor. *The New England journal of medicine*, v. 286, n. 1, p. 8–14, jan. 1972.

PARENT, M.; PARENT, A. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. **The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques**, v. 37, n. 3, p. 313–319, 2010.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy ([Reprod .]) by James Parkinson ,... p. 1–67, 1817.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 223–36; discussion 222, 2002.

PASCUAL-LEONE, A. et al. Akinesia in Parkinson's disease. II. Effects of subthreshold repetitive transcranial motor cortex stimulation. **Neurology**, v. 44, n. 5, p. 892–898, maio 1994.

PASCUAL, A. et al. GDNF and protection of adult central catecholaminergic neurons. **Journal of molecular endocrinology**, v. 46, n. 3, p. R83-92, jun. 2011.

PAVÓN, N. et al. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 1, p. 64–74, 2006.

PEREZ-LLORET, S.; RASCOL, O. Efficacy and safety of amantadine for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, mar. 2018.

PETZINGER, G. M. et al. Effects of Treadmill Exercise on Dopaminergic Transmission in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Lesioned Mouse Model of Basal Ganglia Injury. **Journal of**

Neuroscience, v. 27, n. 20, p. 5291–5300, 2007.

PICCONI, B. et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 5, p. 501–506, 2003.

PICCONI, B. et al. Abnormal Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II function mediates synaptic and motor deficits in experimental parkinsonism. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 23, p. 5283–5291, jun. 2004.

PICCONI, B. et al. Inhibition of phosphodiesterases rescues striatal long-term depression and reduces levodopa-induced dyskinesia. **Brain : a journal of neurology**, v. 134, n. Pt 2, p. 375–387, fev. 2011.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature reviews. Disease primers**, v. 3, p. 17013, mar. 2017.

POULTON, N. P.; MUIR, G. D. Treadmill training ameliorates dopamine loss but not behavioral deficits in hemi-parkinsonian rats. **Experimental neurology**, v. 193, n. 1, p. 181–197, maio 2005.

PRESCOTT, I. A. et al. Levodopa enhances synaptic plasticity in the substantia nigra pars reticulata of Parkinson's disease patients. **Brain : a journal of neurology**, v. 132, n. Pt 2, p. 309–318, fev. 2009.

PROTAS, E. J. et al. Gait and step training to reduce falls in Parkinson's disease. **NeuroRehabilitation**, v. 20, n. 3, p. 183–190, 2005.

QUINN, N. P. Classification of fluctuations in patients with Parkinson's disease. **Neurology**, v. 51, n. 2 Suppl 2, p. S25-9, ago. 1998.

RASCOL, O. et al. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. **The New England journal of medicine**, v. 342, n. 20, p. 1484–1491, maio 2000.

RASCOL, O. et al. Idazoxan, an alpha-2 antagonist, and L-DOPA-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 16,

n. 4, p. 708–713, jul. 2001.

RASCOL, O. et al. Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. **Lancet (London, England)**, v. 359, n. 9317, p. 1589–1598, maio 2002.

RASCOL, O. et al. Rasagiline as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations (LARGO, Lasting effect in Adjunct therapy with Rasagiline Given Once daily, study): a randomised, double-blind, parallel-group trial. **Lancet (London, England)**, v. 365, n. 9463, p. 947–954, mar. 2005.

REUTER, I. et al. The effect of exercise on pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 15, n. 5, p. 862–868, set. 2000.

RIVERA-CALIMLIM, L. et al. L-dopa treatment failure: explanation and correction. *British medical journal*, v. 4, n. 5727, p. 93–94, out. 1970.

ROOF, R. L. et al. A Comparison of Long-Term Functional Outcome After 2 Middle Cerebral Artery Occlusion Models in Rats. p. 2648–2657, 2001.

RUSSO-NEUSTADT, A. et al. Physical activity-antidepressant treatment combination: impact on brain-derived neurotrophic factor and behavior in an animal model. **Behavioural brain research**, v. 120, n. 1, p. 87–95, abr. 2001.

SACKS, O. **Awakenings**. 1990.

SANDHU, J. K. et al. Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. **Neurobiology of disease**, v. 33, n. 3, p. 405–414, mar. 2009.

SANTINI, E. et al. Critical Involvement of cAMP/DARPP-32 and Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Signaling in L-DOPA-Induced Dyskinesia. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 26, p. 6995–7005, 2007.

SCHALLERT, T.; WOODLEE, M. T. Brain-dependent movements and

cerebral-spinal connections: key targets of cellular and behavioral enrichment in CNS injury models. **Journal of rehabilitation research and development**, v. 40, n. 4 Suppl 1, p. 9–17, 2003.

SCHENKMAN, M. et al. Exercise to improve spinal flexibility and function for people with Parkinson's disease: a randomized, controlled trial. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 46, n. 10, p. 1207–1216, out. 1998.

SCHRAG, A. et al. Depression rating scales in Parkinson's disease: critique and recommendations. *Movement disorders* : official journal of the Movement Disorder Society, v. 22, n. 8, p. 1077–1092, jun. 2007.

SCHMIDT-HIEBER, C.; JONAS, P.; BISCHOFBERGER, J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. **Nature**, v. 429, n. 6988, p. 184–187, maio 2004.

SCHWAB, R. S. et al. Amantadine in the treatment of Parkinson's disease. **JAMA**, v. 208, n. 7, p. 1168–1170, maio 1969.

SINGLETON, A. B. et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, v. 302, n. 5646, p. 841, out. 2

SMITH, B. A.; GOLDBERG, N. R. S.; MESHUL, C. K. Effects of treadmill exercise on behavioral recovery and neural changes in the substantia nigra and striatum of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse. **Brain research**, v. 1386, p. 70–80, abr. 2011.

SNOW, B. J. et al. The effect of amantadine on levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: a double-blind, placebo-controlled study. **Clinical neuropharmacology**, v. 23, n. 2, p. 82–85, 2000.

SPILLANTINI, M. G. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature England*, ago. 1997.

STOCCHI, F. et al. AFQ056 in Parkinson patients with levodopa-induced dyskinesia: 13-week, randomized, dose-finding study. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 28,

n. 13, p. 1838–1846, nov. 2013.

STUDER, V. et al. Treadmill Training with Cues and Feedback Improves Gait in People with More Advanced Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's disease**, v. 7, n. 4, p. 729–739, 2017.

TAJIRI, N. et al. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. **Brain research**, v. 1310, p. 200–207, jan. 2010.

TERZIC, D.; ABOSCH, A. Update on deep brain stimulation for Parkinson's disease. **Journal of neurosurgical sciences**, v. 56, n. 4, p. 267–277, dez. 2012.

THANVI, B.; LO, N.; ROBINSON, T. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment. **Postgraduate medical journal**, v. 83, n. 980, p. 384–388, jun. 2007.

THAUT, M. H. et al. Rhythmic auditory stimulation in gait training for Parkinson's disease patients. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 11, n. 2, p. 193–200, mar. 1996.

THORN, C. A. et al. Differential dynamics of activity changes in dorsolateral and dorsomedial striatal loops during learning. *Neuron*, v. 66, n. 5, p. 781–795, jun. 2010.

THRELFELL, S.; CRAGG, S. J. Dopamine signaling in dorsal versus ventral striatum: the dynamic role of cholinergic interneurons. **Frontiers in systems neuroscience**, v. 5, p. 11, 2011.

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

TOMLINSON, C. L. et al. Physiotherapy intervention in Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 345, p. e5004, ago. 2012.

TOOLE, T. et al. The effects of a balance and strength training program on equilibrium in Parkinsonism: A preliminary study.

NeuroRehabilitation, v. 14, n. 3, p. 165–174, 2000.

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

TRENKWALDER, C. et al. A Placebo-Controlled Trial of AQW051 in Patients With Moderate to Severe Levodopa-Induced Dyskinesia. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 31, n. 7, p. 1049–1054, jul. 2016.

TROIANO, A. R. et al. PET demonstrates reduced dopamine transporter expression in PD with dyskinesias. **Neurology**, v. 72, n. 14, p. 1211–1216, abr. 2009.

VAN HILTEN, J. J. et al. Sleep, excessive daytime sleepiness and fatigue in Parkinson's disease. **Journal of neural transmission. Parkinson's disease and dementia section**, v. 5, n. 3, p. 235–244, 1993.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F. H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 3, p. 266–270, mar. 1999.

VANLEEUWEN, J.-E. et al. Altered AMPA receptor expression with treadmill exercise in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. **Journal of neuroscience research**, v. 88, n. 3, p. 650–668, fev. 2010.

VAYNMAN, S.; YING, Z.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields. **Journal of neuroscience research**, v. 76, n. 3, p. 356–362, maio 2004.

VIJVERMAN, A.-C.; FOX, S. H. New treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 7, n. 6, p. 761–777, nov. 2014.

VILLAR-CHEDA, B. et al. Aging and sedentarism decrease vascularization and VEGF levels in the rat substantia nigra. Implications for Parkinson's disease. **Journal of cerebral blood flow and**

metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, v. 29, n. 2, p. 230–234, fev. 2009.

VUCKOVIC, M. G. et al. Exercise elevates dopamine D2 receptor in a mouse model of Parkinson's disease: in vivo imaging with [(1)(8)F]fallypride. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 25, n. 16, p. 2777–2784, dez. 2010.

W., F.; MARTHE, V. Acetylcholine synthesis in different regions of the central nervous system. **The Journal of Physiology**, v. 107, n. 3, p. 372–381, 1948.

WALUSINSKI, O. Jean-Martin Charcot and Parkinson's disease: Teaching and teaching materials. **Revue neurologique**, abr. 2018.

WANG, Q.; ZHANG, W. Maladaptive Synaptic Plasticity in L-DOPA-Induced Dyskinesia. **Frontiers in neural circuits**, v. 10, p. 105, 2016.

WESTIN, J. E. et al. Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. **Biological psychiatry**, v. 62, n. 7, p. 800–810, out. 2007.

WILLIAMS, A. et al. Deep brain stimulation plus best medical therapy versus best medical therapy alone for advanced Parkinson's disease (PD SURG trial): a randomised, open-label trial. **The Lancet. Neurology**, v. 9, n. 6, p. 581–591, jun. 2010.

WILLIAMS, N. R.; OKUN, M. S. Deep brain stimulation (DBS) at the interface of neurology and psychiatry. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 11, p. 4546–4556, nov. 2013.

WONG, J. K. et al. STN vs. GPi deep brain stimulation for tremor suppression in Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. **Parkinsonism & related disorders**, ago. 2018.

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