

**O exercício físico como agente modificador da
doença de Parkinson e das discinesias induzidas
por L-DOPA – evidências obtidas em modelos
experimentais**

Aderbal Silva Aguiar Júnior

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**O EXERCÍCIO FÍSICO COMO AGENTE MODIFICADOR DA
DOENÇA DE PARKINSON E DAS DISCINESIAS INDUZIDAS POR
L-DOPA – EVIDÊNCIAS OBTIDAS EM MODELOS
EXPERIMENTAIS**

ADERBAL SILVA AGUIAR JÚNIOR

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia,
como requisito para obtenção do
título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel
Schröder Prediger

Co-orientador: Prof. Dr. Adair
Roberto Soares dos Santos

Florianópolis - SC

Agosto/2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

A282e Aguiar Júnior, Aderbal Silva

O exercício físico como agente modificador da doença de Parkinson e das discinesias induzidas por L-DOPA [tese] : evidências obtidas em modelos experimentais / Aderbal Silva Aguiar Júnior ; orientador, Rui Daniel Schröder Prediger. - Florianópolis, SC, 2011.
168 p.: grafs., tabs.

Tese| (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Exercícios físicos. 3. Doença de Parkinson. 4. Oxidopamina. 5. MPTP. 6. Dopa. 7. Camundongo como animal de laboratório - Comportamento. 8. Agentes Neuroprotetores. 9. Agentes Antidiscinéticos. I. Prediger, Rui Daniel Schröder. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

O exercício físico como agente modificador da doença de Parkinson e das discinesias induzidas por L-DOPA – evidências obtidas em modelos experimentais


ADERBAL SILVA AGUIAR JUNIOR

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:



Adair Roberto Soares dos Santos
Presidente (Departamento de Farmacologia/UFSC)


Leandro José Bertoglio
(Departamento de Farmacologia/UFSC)


José Eduardo da Silva Santos
(Departamento de Farmacologia/UFSC)


Rodrigo Pinto dos Santos Antunes da Cunha
(Instituto de Bioquímica/Universidade de Coimbra/Portugal)


Sidarta Tollendal Gomes Ribeiro
(Departamento de Fisiologia/UFRN)


Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC
Florianópolis, 30 de Agosto de 2011.

*“A força não provém da capacidade física, e sim de uma
vontade indomável.”*
Mahatma Gandhi

Dedico esta tese à minha esposa Ana Elisa Speck Aguiar.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger, por acreditar e investir em mim e meu trabalho. Mas principalmente obrigado pela confiança e oportunidades. Ao Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, por aceitar ser meu co-orientador e pelo auxílio nas questões burocráticas.

Aos membros da banca, professores doutores Rodrigo Pinto dos Santos Antunes da Cunha, do Instituto de Bioquímica do Centro de Neurociências da Universidade de Coimbra/Portugal, e Sidarta Tollendal Gomes Ribeiro, do Departamento de Fisiologia da UFRN, que aceitaram se deslocar até Florianópolis para participar desta sessão de defesa. E aos professores doutores Leandro José Bertoglio, que acompanhou meu trabalho desde o início do doutorado, e José Eduardo da Silva Santos, pelo aceite de ambos também nesta etapa da defesa, após valiosa contribuição na qualificação.

Aos colegas de (i) laboratório: Daniel Rial, Filipe Carvalho Matheus, Paulo Alexandre de Oliveira, e George Boemer; do (ii) Departamento de Farmacologia: Alexandre Hoeller e Marcelo Duzzioni, e do (iii) Departamento de Bioquímica: Eduardo Moreira, Adalberto Castro (meu mano), e Fabiano Córdova. Aos 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.

Aos professores doutores Alexandra Susana Latini, Andreza Fabro de Bem, Carla Inês Tasca, e Rodrigo Bainy Leal do Departamento de Bioquímica da UFSC; ao prof. Dr. Cláudio da Cunha, do Departamento de Farmacologia da UFPR/Curitiba; ao prof. Dr. Juliano Ferreira do Departamento de Química da UFSM; à prof^a. Dra. Elaine Aparecida Del Bel do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da USP/Ribeirão Preto, pelas importantes colaborações ao meu trabalho. Em especial às doutoras Rita Raisman-Vozari e Laurence Lanfumey do INSERM/Paris, onde realizei meu estágio sanduíche no exterior, pela recepção em seus laboratórios, trocas de experiências e colaboração na realização de alguns experimentos que compõem esta tese.

Ao CNPq, CAPES e FAPESC pela concessão da bolsa de doutorado e suporte financeiro para execução deste projeto, assim como ao Departamento de Farmacologia/UFSC, IBRO e SBNeC pelo suporte financeiro para viagens a congressos internacionais.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doença de Parkinson: história, etiopatologia, clínica e tratamento	1
2. Exercício físico: um agente antiparkinsoniano?	15
2. OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Animais	27
3.2. Drogas	27
3.3. Desenhos experimentais	29
3.3.1. <i>Experimento 1 – 6-OHDA versus exercício.</i>	29
3.3.2. <i>Experimento 2 – MPTP versus exercício.</i>	31
3.3.3. <i>Experimento 3 – Discinesias induzidas pela L-DOPA versus exercício.</i>	33
3.4. Experimentos comportamentais	35
3.4.1. <i>Discriminação olfatória</i>	35
3.4.2. <i>Respostas de medo condicionado</i>	35
3.4.3. <i>Labirinto aquático</i>	36
3.4.4. <i>Rota-rod</i>	38
3.4.5. <i>Cilindro</i>	38
3.4.6. <i>Campo aberto</i>	39
3.5. Desafios farmacológicos	39
3.5.1. <i>Alterações locomotoras induzidas por (-)-quinpirole</i>	39
3.5.2. <i>Comportamento de escalada induzida por R(-)-apomorfina</i>	39
3.5.3. <i>Catalepsia induzida por haloperidol</i>	40
3.5.4. <i>Rotações induzidas por R(-)-apomorfina</i>	41
3.5.5. <i>Discinesias induzidas pela L-DOPA</i>	42
3.5.6. <i>Hipotermia induzida pelo MPTP</i>	43
3.6. Experimentos bioquímicos	43
3.6.1. <i>Imunodeteção de proteínas</i>	43
3.6.2. <i>Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)</i>	46
3.6.3. <i>Atividades enzimáticas</i>	47
3.6.4. <i>Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA)</i>	49
3.6.5. <i>Radioisótopos</i>	50

3.7. Análise estatística	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1. O exercício de corrida aumenta a atividade muscular mitocondrial em camundongos.....	53
4.2. O exercício previne os prejuízos motores induzidos pela administração intra-estriatal de 6-OHDA em camundongos	55
4.3. O exercício atenua as rotações induzidas por R(-)-apomorfina em camundongos tratados com 6-OHDA pela via intra-estriatal	55
4.4. O exercício previne a degeneração da via dopaminérgica nigro- estriatal induzida pela administração intra-estriatal de 6-OHDA	57
4.5. O exercício não previne as alterações olfatórias induzidas pela administração intranasal de MPTP	59
4.6. O exercício previne os prejuízos nas memórias implícitas induzidos pela administração intranasal de MPTP	60
4.7. O exercício atenua a disfunção mitocondrial induzida pelo MPP ⁺ , mas não protege contra a neurodegeneração dopaminérgica induzida pela administração intranasal de MPTP	61
4.8. O exercício aumenta a hipotermia induzida pelo MPTP: possível relação com sua atividade antioxidante	63
4.9. O exercício previne a super-sensibilidade dos receptores dopaminérgicos do tipo D ₂ após a administração intranasal de MPTP	66
4.10. O tratamento crônico com L-DOPA reduz a assimetria motora nos camundongos hemiparkinsonianos.....	69
4.11. O exercício físico atenua as discinesias e as alterações na transmissão glutamatérgica e sinalização intracelular induzidas pelo tratamento crônico com L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos	70
5. DISCUSSÃO.....	73
6. CONCLUSÕES.....	87
6. REFERÊNCIAS.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tremor e reserpina..	3
Figura 2. História, quadro clínico e patológico da doença de Parkinson.	9
Figura 3. Drogas em desenvolvimento para o tratamento da doença de Parkinson.	13
Figura 4. Número de trabalhos sobre exercício e sedentarismo disponíveis nas bases de dados Pubmed e Scopus.....	16
Figura 5. Exercício físico e cinesioterapia.....	18
Figura 6. Neurotoxinas utilizadas no desenvolvimento de modelos experimentais da doença de Parkinson.	22
Figura 7. Censo Brasil sobre a idade da população brasileira por faixa etária 1991-2010.....	24
Figura 8. Desenho experimental 1: 6-OHDA versus exercício.	29
Figura 9. Esteira ergométrica adaptada para camundongos.....	30
Figura 10. Administração intra-estriatal de 6-OHDA.....	31
Figura 11. Desenho experimental 2: MPTP versus exercício.....	32
Figura 12. Administração intranasal de MPTP.....	33
Figura 13. Desenho experimental 3: discinesias induzidas pela L-DOPA versus exercício.	33
Figura 14. Rodas de correr e as discinesias induzidas pelo tratamento com L-DOPA.	34
Figura 15. Tarefas para avaliação sensorial e cognitiva.	37
Figura 16. Tarefas para avaliação da coordenação motora, assimetria e locomoção.	38
Figura 17. Os aparatos utilizados nos experimentos de desafios farmacológicos.....	40
Figura 18. O protocolo de exercício e as modificações atléticas induzidas pela corrida em esteira nos camundongos.	53
Figura 19. As distâncias e velocidades de corridas diárias realizadas pelos camundongos hemiparkinsonianos tratados com L-DOPA nas rodas de correr voluntárias.....	54
Figura 20. Os efeitos do exercício e do tratamento intra-estriatal com 6-OHDA no desempenho motor de camundongos avaliados nos testes do rota-rod e do cilindro.	56

Figura 21. Os efeitos do exercício sobre as rotações induzidas por R(-)-apomorfina em camundongos hemiparkinsonianos.	57
Figura 22. Os efeitos do exercício sobre a neurodegeneração nigro-estriatal induzida pela administração intra-estriatal de 6-OHDA em camundongos.	58
Figura 23. Os efeitos do exercício sobre o prejuízo olfatório e danos no bulbo olfatório induzidos pela administração intranasal de MPTP em camundongos.	59
Figura 24. Os efeitos do exercício sobre os prejuízos na memória operacional de camundongos induzidos pela administração intranasal de MPTP avaliados no labirinto aquático.	61
Figura 25. Os efeitos do exercício sobre os prejuízos na memória de procedimento de camundongos induzidos pela administração intranasal de MPTP avaliados pelo medo condicionado ao som.	62
Figura 26. O exercício não protege a degeneração nigro-estriatal induzida pela administração intranasal de MPTP em camundongo.	63
Figura 27. Avaliação da inibição da atividade do complexo I induzida por rotenona e MPP ⁺ em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos exercitados.	64
Figura 28. Os efeitos do exercício agudo e da administração intranasal de MPTP sobre a temperatura retal de camundongos.	65
Figura 29. Os efeitos do exercício sobre a atividade antioxidante dependente de glutathione no estriado dos camundongos após 6 h do tratamento intranasal com MPTP.	66
Figura 30. Os efeitos do exercício sobre os desafios farmacológicos com R(-)-apomorfina, haloperidol e (-)-quinpirole nos camundongos tratados com MPTP intranasal.	68
Figura 31. Os prejuízos motores causados pela administração intra-estriatal de 6-OHDA são atenuados pela L-DOPA.	69
Figura 32. Os efeitos do exercício nas discinesias induzidas pela L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos.	71
Figura 33. Os efeitos do exercício sobre as alterações na neurotransmissão glutamatérgica e sinalização intracelular induzidas pelo tratamento crônico com L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. A história clínico-patológica da DP.....	10
Tabela 2. Escala de estadiamento de Hoehn e Yahr (1967).....	11
Tabela 3. Estudos clínicos investigando os efeitos do exercício físico em pacientes Parkinsonianos.	19
Tabela 4. Neurotoxinas utilizadas no presente estudo.....	28
Tabela 5. Drogas utilizadas no presente estudo.....	29
Tabela 6. Anticorpos primários utilizados no presente estudo.	45
Tabela 7. Estudos investigando os efeitos do exercício físico em modelos experimentais de Parkinsonismo.	122

LISTA DE ABREVIÇÕES

6-OHDA – 6-hidroxi-dopamina	HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão
ACh – acetilcolina	HVA – ácido homovanílico
ANCOVA – análise de covariância	LTD – depressão de longa duração
ANOVA – análise de variância	LTP – potenciação de longa duração
BWSTT – suporte parcial do peso corporal	MAO-B – monoamino oxidase B
COMT – catecol- <i>O</i> -metil-transferase	MPP ⁺ – 1-metil-4-fenilpiridina
CDK5 – quinase 5 dependente de ciclina	MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
CS – citrato sintase	NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
DA – dopamina	RPM – rotações por min
DARPP-32 – fosfoproteína regulada por DA e AMPc de 32 kDa	Sed – sedentário
DAT – transportador de DA	<i>SN</i> – <i>substantia nigra</i>
DCFH-DA – diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína	SNC – sistema nervoso central
DOPAC – ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético	<i>SNpc</i> – <i>substantia nigra pars compacta</i>
DP – doença de Parkinson	TH – tirosina hidroxilase
EROs – espécies reativas de oxigênio	UPDRS – <i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>
Exe – exercício	$\dot{V}O_2$ – consumo de oxigênio pelos tecidos
Glu – glutamato	$\dot{V}O_{2max}$ – consumo máximo de oxigênio pelos tecidos
GPx – GSH peroxidase	χ^2 – chi-quadrado.
GR – GSH redutase	
GSH – glutationa total	
H&Y – Hoehn & Yahr	
H ₂ O ₂ – peróxido de hidrogênio	

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a doença neurodegenerativa motora mais prevalente na população, com maior incidência nos idosos. Algumas características importantes desta doença, como o seu caráter progressivo, a presença de sintomas não motores que em grande parte não respondem aos fármacos antiparkinsonianos disponíveis atualmente, e a perda de eficácia e o aparecimento de efeitos colaterais sérios após o tratamento crônico com fármacos dopaminérgicos, representam verdadeiros desafios às comunidades clínica e acadêmica. Existe um grande esforço na busca de agentes neuroprotetores e modificadores da DP, ou que aliviem os efeitos colaterais do tratamento, principalmente as discinesias, associados ao uso crônico da L-DOPA. Nas últimas duas décadas, um número crescente de trabalhos clínicos e experimentais tem sugerido o potencial do exercício físico como um agente paliativo ou adjuvante na DP. Os resultados desta tese demonstram que a capacidade neuroprotetora do exercício físico é dependente do modelo experimental utilizado, sendo observada em camundongos hemiparkinsonianos após lesão unilateral com 6-OHDA intra-estriatal. A prevenção da disfunção mitocondrial e do estresse oxidativo são mecanismos potencialmente envolvidos nesta ação neuroprotetora do exercício. Por outro lado, o mesmo protocolo de corrida em esteira durante seis semanas não protegeu a degeneração da via nigro-estriatal induzida pelo tratamento intranasal com MPTP em camundongos. Além disso, foi possível caracterizar uma série de propriedades modificadoras do exercício nos modelos experimentais da DP utilizados no presente estudo. O exercício em esteira ergométrica durante seis semanas atenuou os prejuízos motores e cognitivos induzidos, respectivamente, pela administração intra-estriatal de 6-OHDA e intranasal de MPTP em camundongos. Enquanto o exercício voluntário durante 14 dias em rodas de correr reduziu a severidade das discinesias induzidas pela L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos. Estes benefícios foram acompanhados de importantes modificações na plasticidade dos núcleos da base dos animais exercitados. O exercício melhorou a função da via indireta dos núcleos da base nos animais tratados com MPTP, através do aumento do número e resposta de receptores do tipo D₂ para dopamina e da diminuição do *turnover* dopaminérgico. O exercício também preveniu modificações na neurotransmissão glutamatérgica e sinalização intracelular no estriado, potencialmente envolvidas no desenvolvimento das discinesias induzidas pela L-DOPA. Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam o potencial do exercício físico como um agente modificador da DP, sendo este capaz de aliviar os prejuízos motores e cognitivos em animais submetidos a modelos experimentais da DP, além de diminuir as discinesias induzidas pelo tratamento com L-DOPA, enquanto a neuroproteção ainda permanece controversa.

Palavras-chave: Exercício; doença de Parkinson; 6-OHDA; MPTP; L-DOPA, comportamento; neuroproteção; discinesias; .

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the most prevalent motor neurodegenerative disease, with higher incidence in the elderly population. Some important features of this disease, such as its progressive nature, the presence of non-motor symptoms that largely do not respond to antiparkinsonian drugs, and the efficacy loss and the emergence of serious side effects after chronic treatment with dopaminergic drugs represent major challenges to clinical and academic communities. There is a great interest in the development of neuroprotective and disease-modifying agents to PD as well as new strategies to alleviate side effects, especially dyskinesia, associated with chronic treatment with L-DOPA. In the last two decades, an increasing number of clinical and experimental studies have indicated the potential of physical exercise as a palliative or adjuvant agent in PD. The results of this thesis demonstrate that the exercise-induced neuroprotection is dependent on the experimental model of parkinsonism used, occurring in hemiparkinsonism models after selective 6-OHDA-induced striatal unilateral lesion in mice, but not after intranasal treatment with MPTP. The prevention of mitochondrial dysfunction and oxidative stress are potential mechanisms associated to the exercise-induced neuroprotective effects. Moreover, it was possible to characterize a series of exercise-induced disease-modifying properties in the experimental models of PD used in this study. The treadmill exercise during 6 weeks attenuated the motor impairments induced by intra-striatal administration of 6-OHDA and cognitive dysfunction induced by intranasal administration of MPTP. Furthermore, voluntary exercise for 14 days in running wheels reduced the severity of L-DOPA-induced dyskinesias in hemiparkinsonian mice. These benefits were accompanied by significant neuroplastic changes in the striatum of exercised animals. Exercise improved the function of the indirect pathway of the basal ganglia in MPTP-treated animals, by increasing the number and responsivity of dopamine D₂ receptors, as well as decreasing dopamine turnover. Exercise also prevented striatal modification in the glutamatergic neurotransmission and intracellular signaling potentially involved in the development of L-DOPA-induced dyskinesias. Altogether, the current findings support the potential of physical exercise as a disease-modifying agent of PD, being able to alleviate motor and cognitive symptoms in animals subjected to experimental models of PD, and to reduce the severity of L-DOPA-induced dyskinesias, while the neuroprotection remains controversial.

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

Lista de publicações durante o desenvolvimento da tese: ► Abstract

Livro editado

Aguiar AS Jr, Prediger RD (Ed.). **Frontiers in Parkinson's disease Research**. Nova Publishers: New York. ISBN: 978-1-61324-230-8. ► [Abstract](#)

Capítulos de livro

Aguiar AS Jr, Prediger RD. Brain in Movement: The Role of Physical Exercise in Parkinson's Disease. In: Lieberman DC (Ed.). **Aerobic Exercise and Athletic Performance**. 1ª ed. New York: Nova Science Publishers, 2010, 85-120. ► [link](#)

Aguiar AS Jr. Neurobiology of Exercise: A Behavioral Intervention to Enhance Hippocampal Function and Plasticity. In: Gärtner A e Frantz D (Ed.). **Hippocampus**. 1ª ed. New York: Nova Science Publishers, 2010, 125-137. ► [link](#)

Aguiar AS Jr, Pinho RA. The Brain Redox Paradox of Physical Exercise. In: Kozyrev D e Slutsky V (Ed.). **Handbook of Free Radicals**. 1ª ed. New York: Nova Science Publishers, 2010, 117-152. ► [Abstract](#)

Artigos

Aguiar AS Jr, Castro AA, Moreira EL, Glaser V, Santos AR, Tasca CI, Latini A, Prediger RD. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. **Mechanisms of Aging and Development** (aceito para publicação).

Prediger RD, Aguiar Jr AS, Matheus FC, Walz R, Antoury L, Raisman-Vozari R, Doty RL. Intranasal administration of neurotoxicants in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. **Neurotox Res** (aceito para publicação).

Prediger RD, Aguiar AS Jr, Moreira EL, Matheus FC, Castro AA, Walz R, De Bem AF, Latini A, Tasca CI, Farina M, Raisman-Vozari R. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. **Curr Pharm Des** 2011, 17, 489-507. ► [Abstract](#)

Prediger RD, Rojas-Mayorquin AE, Aguiar AS Jr, Chevarin C, Mongeau R, Hamon M, Lanfumey L, Del Bel E, Muramatsu H, Courty J, Raisman-Vozari R. Mice with genetic deletion of the heparin-binding growth factor midkine exhibit early preclinical features of Parkinson's disease. **J Neural Transm** 2011, 118, 1215-25. [▶ Abstract](#)

Moreira EL, Rial D, Aguiar AS Jr, Figueiredo CP, Siqueira JM, DalBó S, Horst H, de Oliveira J, Mancini G, dos Santos TS, Villarinho JG, Pinheiro FV, Marino-Neto J, Ferreira J, De Bem AF, Latini A, Pizzolatti MG, Ribeiro-do-Valle RM, Prediger RD. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. **J Neural Transm** 2010, 117, 1337-51. [▶ Abstract](#)

Aguiar AS Jr, Boemer G, Rial D, Cordova FM, Mancini G, Walz R, de Bem AF, Latini A, Leal RB, Pinho RA, Prediger RD. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. **Neuroscience** 2010, 171, 1216-27. [▶ Abstract](#)

Figueiredo CP, Pamplona FA, Mazzuco TL, Aguiar AS Jr, Walz R, Prediger RD. Role of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its receptor in the central nervous system: therapeutic potential in neurological diseases. **Behav Pharmacol** 2010, 21, 394-408. [▶ Abstract](#)

Prediger RD, Aguiar AS Jr, Rojas-Mayorquin AE, Figueiredo CP, Matheus FC, Ginestet L, Chevarin C, Bel ED, Mongeau R, Hamon M, Lanfumey L, Raisman-Vozari R. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotox Res** 2010, 17, 114-29. [▶ Abstract](#)

Aguiar AS Jr, Araújo AL, da-Cunha TR, Speck AE, Ignácio ZM, De-Mello N, Prediger RD. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Res Bull** 2009, 79, 452-7. [▶ Abstract](#)

Aguiar AS Jr, Tuon T, Albuquerque MM, Rocha GS, Speck AE, Araújo JC, Dafré AL, Prediger RD, Pinho RA. The exercise redox paradigm in the Down's syndrome: improvements in motor function and increases in blood oxidative status in young adults. **J Neural Transm** 2008, 115, 1643-50. [▶ Abstract](#)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Parkinson: história, etiopatologia, clínica e tratamento

O tremor é um sintoma muito presente em textos médicos orientais desde 5.000 anos A.C.¹, e os relatos de valor histórico chegaram à literatura ocidental, principalmente em ficções ou biografias de diversos autores, desde Leonardo Da Vinci a William Shakespeare, que citavam a paralisia agitante (do latim – *paralysis agitans*; do inglês – *shaking palsy*) de modo heterogêneo. Em 1690, o médico húngaro Ferenc Páriz (1649-1716) descreveu os sintomas da paralisia agitante em seu tratado médico *Pax Corporis*: tremor, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural. Mais de um século depois, o médico londrino James Parkinson (1755-1824) chegou às mesmas conclusões que Páriz em sua famosa monografia “*An Essay on the Shaking Palsy*” (1817) dividida em cinco capítulos, retratando de modo singular esta condição conhecida atualmente como doença de Parkinson (DP) [revisado em Parkinson (2002)]. No capítulo II, ele descreve dois sintomas patognomônicos da doença: o tremor de repouso (*tremor coactus*) e a marcha festinante (*scelotyrbe festinans*). Na evolução da doença, Parkinson descreveu outros sintomas como a assimetria, a disartria e quedas frequentes, e sintomas não motores como a obstipação progressiva, dificuldades de deglutição, sialorréia e incontinência urinária. No diagnóstico diferencial, o autor excluiu as convulsões e outros distúrbios do movimento como a distonia e o balismo. Para James Parkinson, os sentidos e o intelecto destes pacientes estavam intactos.

Entre 1860 e 1890, trabalhando no *Hôpital de la Salpêtrière* em Paris, o médico francês Jean Charcot (1825-1893) achou conflitos entre o diagnóstico de esclerose múltipla e da *paralysis agitans* dado aos moribundos [revisado em Goetz (2002)]. Primeiro, ele diferenciou os tremores, em relação à frequência, amplitude, e associação ao movimento ou repouso (Figura 1). Nos pacientes com tremor de repouso, Charcot também observou rigidez, dificuldade de equilíbrio, e lentidão dos movimentos. Entretanto, Charcot estava inflexível que o termo *paralysis agitans* era inadequado, pois observou que os pacientes com tremor de repouso não apresentavam fraqueza muscular [revisado em Sacks (1990) e Goetz e Bonduelle (1995)]. Esta condição estava associada ao tremor de

¹ A medicina *Ayurveda* indiana chegou a tratar estes pacientes com feijão-roxo (*Mucuna pruriens*), que possui L-DOPA em quantidade terapêutica.

movimento, prejuízos sensoriais, problemas visuais e nistagmo presentes na esclerose múltipla (Goetz, 2002).

Após uma longa e frustrante busca, Charcot obteve uma cópia do *Essay* de Parkinson através do Dr. Windsor, bibliotecário da Universidade de Manchester, que foi traduzido para o francês pelos seus residentes [revisado em Goetz (2002)]. Charcot conferiu os créditos da primeira descrição da doença ao inglês (francês – *la maladie de Parkinson*), provavelmente por desconhecer os textos húngaros de Páriz, e preencheu as lacunas que faltavam na descrição de Parkinson. Charcot descreveu com detalhes os quatro sinais cardinais da DP: (i) tremor de repouso (4-6 Hz), (ii) bradicinesia, (iii) alterações posturais e de marcha (propulsão e retropulsão), e (iv) rigidez muscular. Charcot também discordou da descrição inicial de Parkinson quanto à preservação das funções cerebrais superiores, e caracterizou o prejuízo na memória e disfunção cognitiva, sintomas hoje bastante aceitos. Além disso, Charcot definiu a DP como um tipo de neurose², ao perceber relação com os sintomas da depressão, catatonia, e histeria, e ausência de uma causa específica para a DP. Charcot também introduziu o uso de anticolinérgicos no tratamento da doença³. Apenas em 1945 constatou-se que os alcalóides solanáceos, como o estramônio, a hiosciamina e a atropina; utilizados como únicos medicamentos efetivos na DP desde Charcot, bloqueavam os efeitos da acetilcolina (Ach) nos núcleos da base (White e Westerbeke, 1961). Destas observações, surgiu a hipótese de cooperação pós-sináptica entre a Ach (excitatória) e a dopamina (DA) (inibitória) no estriado (Barbeau, 1962; Threlfell e Cragg, 2011).

² Termo utilizado na sua época para definir doenças que não tinham uma lesão própria no sistema nervoso.

³ A hiosciamina, um alcalóide derivado de plantas da família *Solanaceae*. Charcot “tropeçou” por acaso nos efeitos terapêuticos do meimendo (*Atropa beladonna*) quando tentava tratar a hipertensão.

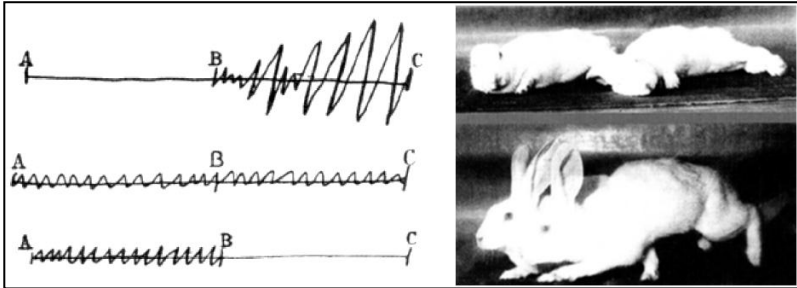


Figura 1. Tremor e reserpina. À esquerda, os desenhos de Charcot para classificar os tremores. AB indica repouso e BC indica movimento. Linha superior: esclerose múltipla. Linhas do meio e inferior: doença de Parkinson. Fonte: Goetz (2002). À direita, coelhos tratados com reserpina (5 mg/kg, i.v.), demonstrando imobilidade antes (acima), mas não após o tratamento com DL-DOPA (200 mg/kg) (abaixo). Fonte: Carlsson (2001).

Os anticolinérgicos só foram substituídos no controle clínico da DP com a introdução da L-DOPA em 1968. Charcot observou Parkinsonismo em um paciente tuberculoso, cujo exame *post-mortem* realizado por seus residentes, Paul Blocq e Gheorghe Marinescu, acusou um tumor confinado no *locus niger*, contralateral ao lado afetado [revisado em Parent e Parent (2010)]. Em 1895, este achado levou Édouard Brissaud a formular a hipótese de envolvimento do *locus niger* [termo moderno: *substantia nigra (SN)*] na DP, que veio a ser confirmado posteriormente em 1919 por Konstantin Trétiakoff, no laboratório do próprio Marinescu, ao observarem a redução do número de células pigmentadas na *SN* do mesencéfalo [revisado em Buda *et al.* (2009)]. Trétiakoff também observou a presença de inclusões citoplasmáticas nas células nigrais, descritas sete anos antes por Fritz Lewy⁴, atualmente reconhecidas como marcadores anatomo-patológicos da DP (Figura 2, página 9). Na mesma época, o neurologista Samuel Alexander Kinnier Wilson descreveu vários episódios de distúrbios do movimento após lesões nos núcleos da base (Vogt, 1911; Wilson, 1912; 1914). Wilson então introduziu o termo ‘sistema extrapiramidal’, para descrever a influência de circuitos núcleos da base ↔ tronco cerebral no controle motor, de modo independente do trato piramidal [revisado em Packard e Knowlton (2002)]. Na metade do século XX, os trabalhos do cientista sueco Arvid Carlsson⁵ impulsionaram o conhecimento da fisiologia, farmacologia e patologia dos núcleos da base (Carlsson, 2001), ao descreverem a reversão de prejuízos motores induzidos

⁴Fritz Heinrich Lewy (1885-1950), enquanto trabalhava no laboratório de Aloisius Alzheimer em Munique, descreveu a presença de inclusões citoplasmáticas no cérebro de pacientes com *paralysis agitans* [revisado em Holdorff (2006)].

⁵ Prêmio Nobel de fisiologia em 2000.

pela reserpina⁶ em coelhos pelo aminoácido DOPA (Figura 1). Entretanto, os níveis de noradrenalina (NA) cerebrais não haviam sido alterados após a administração da DOPA, e o interesse cresceu no intermediário da conversão DOPA → NA: a DA (Carlsson, 1959a).

O isômero L- do aminoácido DOPA havia sido isolado primeiramente em 1913 da vagem da Fava Ordinária (*Vicia faba*). O interesse aumentou em 1938 com a descoberta do papel da enzima DOPA-descarboxilase na conversão enzimática *in vivo* L-DOPA → DA, sendo o primeiro aminoácido biologicamente ativo na síntese de catecolaminas [revisado em Hornykiewicz (2002)]. Ao contrário da DA, o seu precursor L-DOPA atravessa a barreira hematoencefálica, e Carlsson demonstrou a reversão dos prejuízos motores induzidos pela reserpina através do uso da DL-DOPA (Carlsson, Lindqvist *et al.*, 1957). Posteriormente, Carlsson e colaboradores descreveram a distribuição particular de DA nos núcleos da base (Carlsson, 1959b), uma região atualmente conhecida pelo papel no controle motor em mamíferos, e inferiu sobre o possível papel da DA e da DOPA na DP. Esta hipótese foi confirmada de modo simultâneo e independente em 1960, na Alemanha (Ehringer e Hornykiewicz, 1960) e Canadá (Barbeau, 1960), através da confirmação *post-mortem* da deficiência dopaminérgica nos circuitos subcorticais de pacientes com a DP. No ano seguinte, foram demonstrados clinicamente os primeiros resultados efetivos de uma dose única de L-DOPA endovenosa no alívio da acinesia de pacientes com DP (Birkmayer e Hornykiewicz, 1961). O médico grego George Cotzias (1918-1977) deu o próximo passo, e obteve remissões dramáticas dos sintomas motores em pacientes com DP através da administração oral de doses elevadas de L-DOPA (Cotzias, 1968). Nos anos de 1970, a indústria químico-farmacêutica DuPont[®] desenvolveu o Sinemet[™], a forma comercial da L-DOPA associada à carbidopa, um inibidor da DOPA-descarboxilase periférica, para diminuir a disponibilidade periférica de DA e seus efeitos adversos gastrointestinais, ao mesmo tempo aumentando a disponibilidade central da mesma.

Nos dois anos seguintes, o neurologista (e escritor) Oliver Sacks descreveu sérios efeitos adversos – motores e psiquiátricos – em pacientes com Parkinsonismo pós-encefálico (Sacks e Kohl, 1970b; a; Sacks, Messeloff *et al.*, 1970), “acordados” com a L-DOPA (Sacks, 1990)⁷. E poucos

⁶ Inibidor do transportador vesicular de monoaminas. Isolado em 1952 da raiz do arbusto asiático (*Rauwolfia serpentina*) por Hugo Bein.

⁷ Os relatos destes efeitos adversos ao “milagroso” L-DOPA foram duramente criticados pela comunidade clínica. Este episódio foi reportado no *best-seller Awakenings* escrito pelo próprio Oliver Sacks em 1973 (Sacks, 1990). Em 1990, o filme adaptado da obra [Tempo de Despertar

anos depois, o mesmo foi descrito para a forma idiopática da doença: flutuações motoras, discinesias e alucinações (Ikeda, Baba *et al.*, 1972; Voller, Deze *et al.*, 1972; Barbeau, 1974; Carlsson, 1974). As discinesias induzidas pela L-DOPA atingem aproximadamente 50% dos pacientes tratados em longo prazo (normalmente após 3-5 anos) (Linazasoro, 2005), na forma típica de uma mistura idiossincrática de coreia (movimentos abruptos de membros) e distonia (movimentos lentos de torção) (Parkes, 1981; Blanchet, Konitsiotis *et al.*, 1998; Cenci, 2007). Os fatores de risco para as discinesias são a neurodegeneração avançada e altas doses de L-DOPA no início do tratamento (Brotchie, 1998; Jankovic, 2005). Existem diversos mecanismos propostos para o desenvolvimento das discinesias induzidas pela L-DOPA, como hiperatividade da neurotransmissão glutamatérgica córtico-estriatal (Blanchet, Konitsiotis *et al.*, 1998; Brotchie, 1998), opióide estriatal (Brotchie, 1998; Samadi, Bedard *et al.*, 2006), e adrenérgica estriatal (Henry, Fox *et al.*, 1999; Rascol, Arnulf *et al.*, 2001), além da excessiva inervação serotoninérgica estriatal (Carlsson, Carta *et al.*, 2007; Carta, Carlsson *et al.*, 2007). Entretanto, todas estas alterações na neurotransmissão estriatal convergem na exacerbação da sinalização da via da fosfoproteína regulada por DA e AMPc de 32 KDa (DARPP-32) nos interneurônios estriatais GABAérgicos (Hakansson, Lindskog *et al.*, 2004; Santini, Valjent *et al.*, 2007). Deve ser ressaltado que mesmo após quase meio século da introdução da L-DOPA, o controle das discinesias induzidas por este fármaco permanece um grande desafio para médicos e cientistas envolvidos com a DP.

Embora os recursos terapêuticos para a DP tenham se ampliado desde o desenvolvimento do Sinemet™ (L-DOPA + carbidopa), a L-DOPA permanece como o tratamento de primeira escolha para a DP⁸. Os recursos farmacológicos permanecem focados no restabelecimento da neurotransmissão dopaminérgica afetada na DP, incluindo (Figura 3, página 13):

- Precusores da DA (L-DOPA), e inibidor da DOPA-descarboxilase periférica (ex.: Carbidopa e Benserazida);
- Anticolinérgicos (ex.: Biperideno, Triexifenidil, Bentropina), para diminuir o desequilíbrio da neurotransmissão de Ach/DA;
- Inibidor das enzimas monoamino oxidase B (iMAO-B) (ex.: Selegilina, Rasagilina) e catecol-*O*-metil-transferase

(1990)], estrelado por Robin Williams e Robert de Niro, foi laureado com 3 prêmios Oscar: melhor filme, melhor história adaptada, e melhor ator (de Niro).

⁸ No Brasil, a L-DOPA é associado à benserazida, outro inibidor da DOPA-descarboxilase periférica, e comercializada sob o nome comercial Prolopa® pela Roche.

(iCOMT) (ex.: Tolcapone e Entacapone), baseado na experiência dos antidepressivos, o objetivo é diminuir o catabolismo da DA por estas duas enzimas;

- Agonistas dopaminérgicos, ergolínicos (ex.: Bromocriptina, Pergolida, Lisurida, e Cabergolina) e não-ergolínicos (ex.: Pramipexole), com alvo nos receptores dopaminérgicos, principalmente do tipo D₂;
- Amantadina, um antagonista glutamatérgico para diminuir a excitabilidade córtico-estriatal e o desequilíbrio da neurotransmissão de Glu/DA.

Hoje, a DP é a síndrome extrapiramidal prevalente na população idosa mundial (Hoehn e Yahr, 2001) com aproximadamente $\frac{2}{3}$ dos pacientes que visitam grandes centros de reabilitação física (Cardoso, Camargos *et al.*, 1998). O envelhecimento é o principal fator de risco da forma esporádica da doença, sendo que sua prevalência de 5-117 casos / 100.000 pessoas atinge 1% da população com idade superior a 50-60 anos (De Rijk, Launer *et al.*, 2000). A etiologia da DP é controversa e representa um fórum de discussão atual da doença, envolvendo principalmente agentes ambientais e fatores genéticos.

A hipótese ambiental da DP foi levantada devido à sua incompleta descrição em textos antigos, em detrimento dos relatos do tremor inespecífico, apesar da apresentação típica em estágios avançados da DP. Por exemplo, a doença de Alzheimer, o acidente vascular encefálico e a epilepsia, não escaparam aos olhos atenciosos de Hipócrates⁹. As descrições da DP só vieram a ocorrer em meados da Idade Moderna (século XVI-XVII) com Páriz, Parkinson e Charcot. Além disso, a associação entre o maior risco de desenvolver a DP e a exposição de agrotóxicos e produtos químicos industriais, como por exemplo, a rotenona¹⁰ e o paraquat¹¹, e outras substâncias como metais (Liou, Tsai *et al.*, 1997; Gorell, Johnson *et al.*, 1998) reforça esta hipótese. No início dos anos 1980, a hipótese ambiental

⁹ Estes relatos foram descritos em textos egípcios, romanos e gregos. Hipócrates (460-377 A.C.), o pai da medicina, chegou a escrever livros destinados especificamente à descrição destas doenças.

¹⁰ Emmanuel Geoffrey isolou a rotenona da raiz da falca acácia (*Robinia nicou*) em 1895. A raiz era utilizada como pesticida e na pescaria por índios sul-americanos. Eles cortavam a raiz e lançavam os pedaços nas lagunas onde havia peixes (Oehme e Mannala, 2001). Foi usada como pesticida, mas seu uso foi proibido em 2005 nos EUA. A OMS classifica como moderadamente perigosa (International Program on Chemical Safety. e Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals.).

¹¹ O herbicida Paraquat foi produzido pela primeira vez em 1961 pela Syngenta. Em 11/7/2007, a Comunidade Europeia anulou a diretiva que autorizava o Paraquat como substância ativa em defensivos agrícolas. Entretanto, este permanece como um dos herbicidas mais utilizados em países em desenvolvimento.

ganhou força com a utilização crescente de outro tipo de substâncias: as drogas de abuso¹². Em 1983, dependentes de ‘drogas de rua’ na faixa etária dos 20-35 anos foram hospitalizados no Vale do Silício (Califórnia, EUA) após o uso intravenoso de 1-metil-4-fenil-4-propionato de piperidina (MPPP), com imobilidade corporal severa (Langston, Ballard *et al.*, 1983)¹³. O neurologista William Langston diagnosticou paradoxalmente estes jovens pacientes como DP, confirmado posteriormente pelo sucesso do tratamento com L-DOPA e análise *post-mortem* (Langston, Ballard *et al.*, 1983; Langston e Palfreman, 1995). Langston também identificou o contaminante 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) como um produto secundário e indesejado na produção clandestina do MPPP¹⁴ (Langston, Ballard *et al.*, 1983), além do papel da enzima monoamino oxidase-B (MAO-B) na conversão do MPTP em 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) no sistema nervoso central (SNC), passível de ser bloqueada por inibidores desta enzima (Heikkila, Manzino *et al.*, 1984; Langston, Irwin *et al.*, 1984). A Figura 6 (página 23) ilustra a biotransformação MPTP → MPP⁺ nos astrócitos, mas também em neurônios serotoninérgicos, localizados no leito vascular cerebral da barreira hematoencefálica, e a captação seletiva do MPP⁺ pelo transportador de DA (DAT), que inibe a atividade do complexo I mitocondrial (Ramsay, Salach *et al.*, 1986). O tratamento com o MPTP induz Parkinsonismo em primatas e roedores (Burns, Chiueh *et al.*, 1983; Langston, Langston *et al.*, 1984; Dauer e Przedborski, 2003; Prediger, Batista *et al.*, 2006; Prediger, Aguiar *et al.*, 2010). O fato de uma simples molécula de piridina causar Parkinsonismo levantou a possibilidade etiológica da DP frente a agentes similares presentes no ambiente, além de introduzir as mitocôndrias na discussão etiopatológica da DP.

¹² Nesta época, laboratórios clandestinos multiplicavam-se para suprir a demanda crescente de opiáceos sintéticos na recém pujante Califórnia, pois o suprimento de heroína para a região havia diminuído drasticamente, devido a conflitos armados envolvendo o Afeganistão (Invasão Soviética, 1979) e os Curdos (contra a Turquia, 1984). No caso do MPTP, a motivação foi outra, a tentativa de desenvolver agentes químicos fora da lista de narcóticos, por grupos de advogados e desenhistas de drogas (*drug-designers*), para produzir substâncias dentro da lei.

¹³ Adicionalmente, resgates históricos encontraram casos de Parkinsonismo induzido pelo MPTP em 2 grupos distintos, como usuários de drogas de rua (Davis, Williams *et al.*, 1979; Wright, Wall *et al.*, 1984), e cientistas de laboratórios químico-farmacêuticos que trabalhavam com piridinas, e manuseavam o MPTP durante longos períodos sem nenhuma proteção (até mesmo sem luvas), por considerar este reagente inerte (Langston e Palfreman, 1995).

¹⁴ Um analgésico opiáceo sintético da série das fenilpiridinas, que possui 70% da potência da morfina. Ela foi sintetizada pela primeira vez em 1977 em condições não ideais (sua garagem) por Barry Kidston, utilizando um trabalho de Albert Ziering (1947). O estudante de química Barry Kidston, de 29 anos, também desenvolveu DP pelo uso do MPPP contaminado (Davis, Williams *et al.*, 1979) e morreu meses depois de overdose. O MPTP, que não possui propriedades opiáceas, é formado como impureza quando um intermediário alcoólico é desidratado em temperatura ambiente, diferente do ideal a -30°C.

Por outro lado, a descoberta em 1996 de mutações autossômicas dominantes no cromossomo 4q21-q23 causando Parkinsonismo familiar reacendeu o interesse na genética da DP¹⁵ (Polymeropoulos, Higgins *et al.*, 1996). No ano seguinte, uma simples mutação (*missense*) G²⁰⁹A no exon 4 no gene SNCA [*synuclein, α (non A4 component of amyloid precursor)*] foi identificada: (i) a substituição de um único aminoácido, Ala53Thr, e (ii) a introdução de um novo sítio de restrição Tsp45I (Polymeropoulos, Lavedan *et al.*, 1997; Polymeropoulos, 1998). Esta mutação, não encontrada nos casos esporádicos (Bennett e Nicholl, 1998; Chan, Jiang *et al.*, 1998), induzia alterações neuropatológicas – a morte de neurônios dopaminérgicos nigrais e a presença de corpos de Lewy – similares à forma idiopática da DP. Desde o SNCA, foram identificados mais de 10 *loci* distintos responsáveis por formas mendelianas raras da DP¹⁶, associados principalmente a disfunção sináptica (Polymeropoulos, Lavedan *et al.*, 1997) e mitocondrial (Biskup, Gerlach *et al.*, 2008). Estas mutações têm sido modeladas em camundongos, moscas de frutas (*Drosophila melanogaster*) e vermes (*Caenorhabditis elegans*) (Carvey, Punati *et al.*, 2006), através da superexpressão de genes autossômicos dominantes como a α -sinucleína e a LRRK2 (*leucine rich repeat kinase 2*) ou mutações pontuais (*knockouts*) para genes autossômicos recessivos como as parkinas e a PINK1 [*phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced novel kinase 1*] (Dawson, Ko *et al.*, 2010).

A patologia da DP envolve a morte de neurônios dopaminérgicos localizados na *substantia nigra pars compacta* (SNpc) do mesencéfalo (Figura 2). Estes neurônios enviam projeções para o corpo estriado (via dopaminérgica nigroestriatal), formado por dois núcleos dos núcleos da base (putâmen e caudado) –, uma parte do sistema extrapiramidal envolvido em processos motores, cognitivos e sensoriais (Packard e Knowlton, 2002). A morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc provoca redução nos níveis estriatais de DA e prejuízos funcionais destes núcleos (Blandini, Nappi *et al.*, 2000). Na SNpc, também são encontradas inclusões eosinofílicas citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy (Figura 2) (principalmente proteínas α -sinucleína e ubiquitina), utilizada

¹⁵ Os investigadores identificaram o gene analisando o DNA de 28 membros de uma família com quase 600 pessoas do vilarejo de Contursi (região de Salerno, sul da Itália): sendo conhecidos atualmente como pedigree Contursi. Descendentes, inclusive alguns que migraram para a América e outras partes da Europa, permitiram traçar sua ascendência de um único casal que viveu na Itália no século 18. Mais de 60 membros da família de ambos os lados do Atlântico têm sido diagnosticado com a DP.

¹⁶ Conhecidos atualmente como genes PARK. A mutação da α -sinucleína é a PARK1.

como um marcador *post-mortem* da DP (Hagan, Middlemiss *et al.*, 1997). Por último, aproximadamente 35% de inibição do complexo I mitocondrial ocorre de forma ubíqua na forma esporádica da doença (Mizuno, Ohta *et al.*, 1989; Parker, Boyson *et al.*, 1989; Schapira, Cooper *et al.*, 1990), de modo semelhante ao induzido pelo MPTP e outras toxinas utilizadas em modelos experimentais da DP.

As características clínicas da DP são semelhantes às de outras doenças neurodegenerativas, especialmente as atrofia de múltiplos sistemas (Hughes, Daniel *et al.*, 1992). Entretanto, ainda não existem exames laboratoriais ou de neuroimagem para o diagnóstico definitivo da doença, sendo o seu uso limitado para o diagnóstico diferencial (Jankovic, 2008). Os critérios diagnósticos descritos originalmente por Charcot foram atualizados, e as diretrizes atuais são frequentemente revisadas pelo *UK Parkinson's Disease Society* e pelo *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS), possibilitando uma acurácia no diagnóstico superior a 75% (Gelb, Oliver *et al.*, 1999): (i) tríade parkinsoniana, tremor de repouso (4-7 Hz, principalmente nas mãos), rigidez muscular (fenótipo plástico), e bradicinesia (Figura 2); (ii) instabilidade postural (Figura 2); e, (iii) boa resposta clínica à L-DOPA.

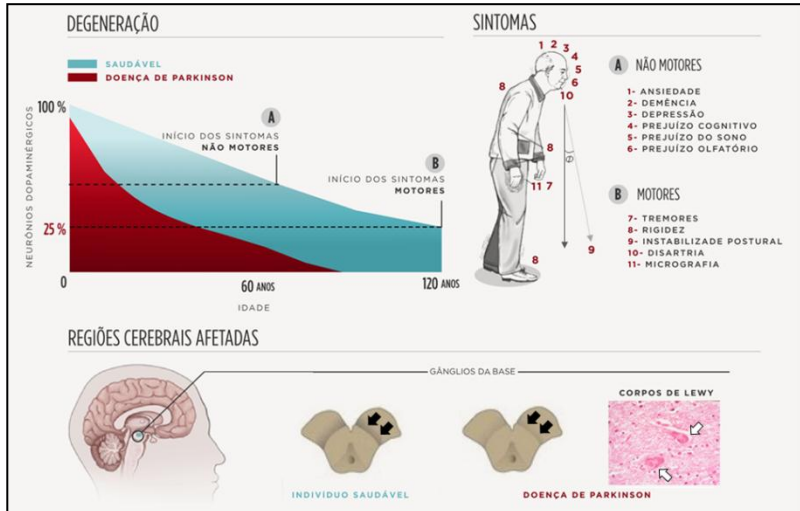


Figura 2. História, quadro clínico e patológico da doença de Parkinson. Esquerda (acima): ilustração da neurodegeneração dopaminérgica verificada na DP e o aparecimento dos sintomas motores e não motores. Direita (acima): clássica ilustração da DP realizada pelo neurologista William Gowers em 1886, baseada no *Essay* de Parkinson. Alguns sintomas motores e não motores ilustram a complexidade da DP. Abaixo: ilustração das evidências *post-mortem* da diminuição de

neuromelanina na *substantia nigra pars compacta* (setas pretas), e da presença de corpos de Lewy (direita, setas brancas).

Os sintomas motores da DP são utilizados no diagnóstico clínico da DP. Entretanto, estes são verificados somente em estágios mais avançados da doença, quando aproximadamente 60-70% dos neurônios dopaminérgicos da *SNpc* encontram-se degenerados e os níveis de DA no estriado já foram depletados em 70-80% (ver Tabela 1) (Riederer e Wuketich, 1976). Também deve ser ressaltado o comprometimento de outras vias dopaminérgicas além da nigroestriatal, como as vias mesolímbicas e mesocorticais, envolvidos no controle de processos sensoriais (como o bulbo olfatório) e cognitivos (como o córtex pré-frontal) (Spanagel e Weiss, 1999; Horvitz, 2000). O processo neurodegenerativo também afeta outros neurotransmissores como os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e colinérgico, todos estes contribuindo para o desenvolvimento dos sintomas não motores da DP (Tabela 1).

Tabela 1. A história clínico-patológica da DP.

H&Y ⁽¹⁹⁶⁷⁾	Manifestações clínicas	Referências
Pré-clínico	<ul style="list-style-type: none"> • Prejuízo olfatório • Depressão, transtornos de ansiedade • Distúrbio do sono e disfunção gastrointestinal 	(Doty, Deems <i>et al.</i> , 1988; Kaneoke, Koike <i>et al.</i> , 1995; Rye, Johnston <i>et al.</i> , 1999)
Precoce	<ul style="list-style-type: none"> • Declínio cognitivo ($1/3$ pacientes) • Depressão, transtornos de ansiedade 	(Kaneoke, Koike <i>et al.</i> , 1995; Braak, Rub <i>et al.</i> , 2006)
Diagnóstico H&Y > 3	<ul style="list-style-type: none"> • Tremor, rigidez muscular, bradicinesia, instabilidade postural • Responsividade à L-DOPA • Depressão, transtornos de ansiedade, psicose • Declínio cognitivo ($2/3$ pacientes) 	(Gelb, Oliver <i>et al.</i> , 1999; Olanow e Tatton, 1999; Braak, Rub <i>et al.</i> , 2006; Fenelon, 2008; Simuni e Sethi, 2008)
H&Y > 4	<ul style="list-style-type: none"> • Depressão, transtornos de ansiedade, psicose • Declínio cognitivo (90% pacientes) e demência 	(Gelb, Oliver <i>et al.</i> , 1999; Braak, Rub <i>et al.</i> , 2006; Fenelon, 2008; Simuni e Sethi, 2008)

O surgimento da L-DOPA e o desenvolvimento de alternativas farmacológicas e cirúrgicas também foram acompanhados pelo desenvolvimento de vários escores clínicos para acompanhar a evolução da doença. O sucesso terapêutico da L-DOPA, os seus efeitos adversos e a maior sobrevida dos pacientes tratados (Hoehn e Yahr, 1967; Joseph, Chassan *et al.*, 1978) exigiu a ampliação e unificação destas escalas. Antes da L-DOPA, a escala desenvolvida por Melvin Yahr e Margaret Hoehn em 1967 (Hoehn e Yahr, 1967) (Tabela 2) era a mais utilizada. Porém tornou-se superficial e obsoleta após as novas opções de tratamento. Nenhuma escala é universalmente aceita, mas numa tentativa de uniformizar os procedimentos, Stanley Fahn desenvolveu a ‘Escala Unificada de Avaliação para a Doença de Parkinson’ (do inglês UPDRS, *Unified Parkinson’s Disease Rating Scale*) (Fahn e Elton, 1987), que avalia os domínios: (i) estado mental, comportamento e humor, (ii) atividades de vida diária, (iii) exame motor, (iv) complicações terapêuticas, (v) escala de Hoehn e Yahr, e (vi) escala de Schwab. Atualmente, a UPDRS é amplamente utilizada por clínicos e pesquisadores, inclusive com uma versão validada para língua portuguesa, e periodicamente revisada, pela Academia Brasileira de Neurologia (Paula *et al.*, 2009).

Tabela 2. Escala de estadiamento de Hoehn e Yahr (1967)

Estágio	Descrição
1	1) Doença unilateral.
1,5	2) Doença axial e unilateral.
2	3) Doença bilateral leve. Sem prejuízo do equilíbrio.
2,5	4) Doença bilateral, com recuperação no ‘teste de tração’ ¹⁷ .
3	5) Doença bilateral leve a moderada. Instabilidade postural. Fisicamente independente.
4	6) Deficiência severa, mas ainda capaz de caminhar ou de ficar de pé sem assistência.
5	7) Confinado à cadeira de rodas ou ao leito. Necessita de assistência.

¹⁷ O examinador se posiciona atrás do paciente e após instruí-lo, avalia a capacidade do paciente de recuperar seu equilíbrio após um puxão brusco para trás.

Além do alívio sintomático, abordagens neuroprotetoras ou modificadoras da DP permanecem uma necessidade não atendida. Entretanto, é importante enfatizar que o desenvolvimento de qualquer tipo de abordagem para a DP é uma tarefa complexa, devido à natureza progressiva da doença, ao conjunto de sintomas motores e não motores, e aos próprios efeitos adversos do tratamento farmacológico (Braak, Rub *et al.*, 2006; Simuni e Sethi, 2008; Aguiar e Prediger, 2010). Antes da introdução da L-DOPA, a DP era considerada essencialmente uma desordem motora, e após a sua chegada, o desenvolvimento de complicações motoras – como as discinesias e fenômenos liga-desliga – e desordens cognitivas e psiquiátricas – como alucinações e delírios – vieram à tona e se somaram aos desafios terapêuticos da doença (Obeso, Rodriguez-Oroz *et al.*, 2009). Entretanto, a introdução de novos fármacos e a possibilidade cirúrgica de tratar pacientes mais graves causaram poucas mudanças, servindo para (i) o refinamento do controle dos sintomas motores, ou (ii) a racionalização do uso da L-DOPA, geralmente para controlar as complicações do uso prolongado da mesma. Entretanto, além do risco cirúrgico (Williams, Gill *et al.*, 2010), a literatura vem destacando “novos” efeitos adversos à hiperestimulação dopaminérgica do tratamento corrente, que vem somar ao já complexo quadro clínico da DP, incluindo alterações comportamentais como a psicose, o ‘transtorno de controle dos impulsos’ (ex.: compulsão por jogos, sexo, compras, e comida), comportamento estereotipado (ex.: hábitos ou colecionar objetos), e compulsão medicamentosa (Weintraub, 2008; Voon, Fernagut *et al.*, 2009).

Apesar dos esforços de pesquisadores e clínicos envolvidos com a DP, parece que esta realidade não será alterada nos próximos anos. A Figura 3 mostra o vigoroso processo de desenvolvimento de novas abordagens antiparkinsonianas. Na verdade, muitas destas abordagens “em desenvolvimento” incluem: (i) a reformulação das drogas já existentes e aprovadas para o uso na DP (ex.: a extensão do tempo de liberação da droga), (ii) o reposicionamento de compostos aprovados para outras doenças [ex.: a isradipina (hipertensão arterial), e o metilfenidato (transtorno de atenção e hiperatividade - TDAH)], e o (iii) o desenvolvimento de novas moléculas ou terapia genética (Meissner, Frasier *et al.*, 2011). Até mesmo a promissora medicina regenerativa passou por recentes constrangimentos após evidências *post-mortem* (Kordower, Chu *et al.*, 2008; Li, Englund *et al.*, 2008) e experimentais (Desplats, Lee *et al.*, 2009; Hansen, Angot *et al.*, 2011) demonstrando propagação neurônio (hospedeiro) → neurônio (enxerto) da α -sinucleína, e a paradoxal formação de corpos de Lewy em neurônios “jovens”, o que acabou criando uma nova linha de

pesquisa em neurodegeneração: a propagação de peptídeos no SNC (ex.: α -sinucleína e β -amilóide) com mecanismos semelhantes às das doenças priônicas (Desplats, Lee *et al.*, 2009; Frost e Diamond, 2010; Goedert, Clavaguera *et al.*, 2010; Hansen, Angot *et al.*, 2011).

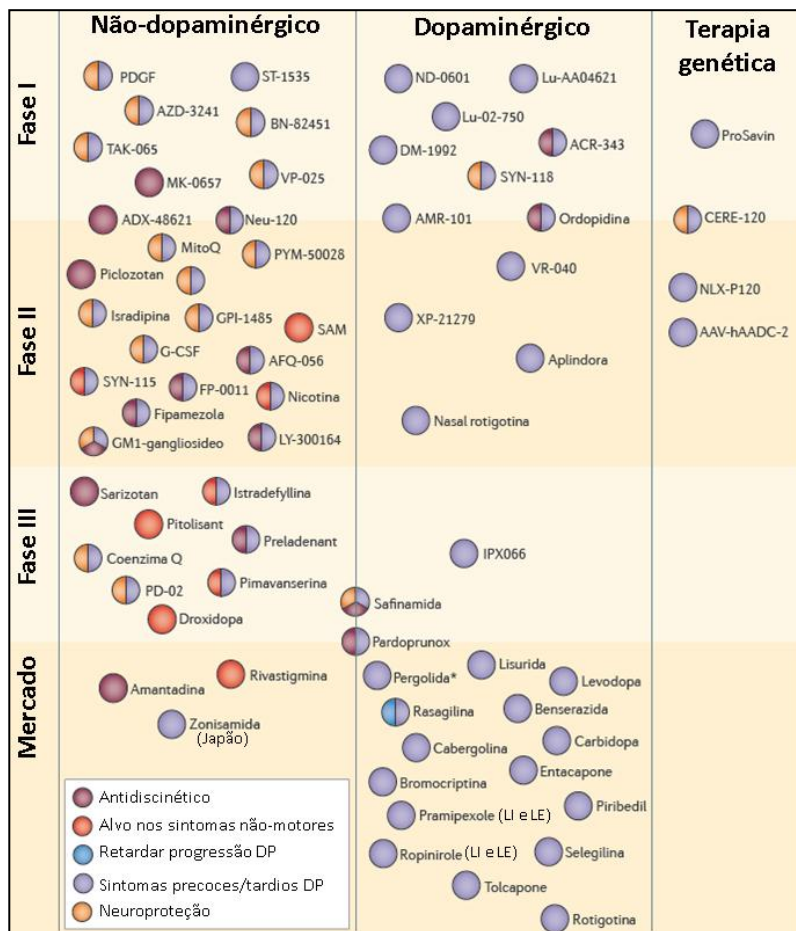


Figura 3. Drogas em desenvolvimento para o tratamento da doença de Parkinson. Adaptado de Meissner, Frasier *et al.*, 2011. LI – liberação imediata; LE – liberação estendida.

Por outro lado, quando os compostos dopaminérgicos são removidos deste cenário (Figura 3), o panorama é menos encorajador. Entretanto, as “novas” formulações dopaminérgicas atuam mais no refinamento dos tratamentos já existentes do que em novas opções para a

DP. Muitos destes novos compostos, tanto dopaminérgicos quanto não dopaminérgicos, são focados nos sintomas motores, ou nas flutuações e discinesias induzidas pela L-DOPA. Apesar dos ensaios clínicos apresentarem desfechos secundários ao manejo da DP, estas novas estratégias antiparkinsonianas falham na resposta a dois problemas emergentes e ainda sem solução: (1) a mudança do paradigma terapêutico de sintomático → modificador da doença, e (2) a redução da crescente prevalência de sintomas não motores, que representam importantes causas de morbidade em longo prazo nos pacientes com DP.

Neste sentido, várias evidências históricas, clínicas e experimentais motivam a investigação do exercício físico como um potencial agente modificador e neuroprotetor para a DP, inclusive no controle de sintomas não motores, sendo este o foco principal da próxima seção e desta tese.

2. Exercício físico: um agente antiparkinsoniano?

Temas como exercício físico, desportos, e jogos são encontrados em textos de civilizações mais primitivas, como os grandes impérios bíblicos de Davi e Salomão, a Mesopotâmia, Egito, Índia e China. O exercício teve grande importância na Ásia Menor, Grécia e Roma antiga, principalmente devido ao seu papel estratégico-militar, sendo documentado por diversos autores da época, como Hipócrates¹⁸ e Galeno¹⁹ (Paffenbarger, Blair *et al.*, 2001). A maior influência para a civilização ocidental veio das teorias de higiene corporal de Galeno (século II), que influenciou regimes de saúde medievais através de sua lista das “seis coisas não naturais”: (i) o ar e o meio ambiente (respiração); (ii) os alimentos e as bebidas (dieta); (iii) o exercício e o repouso; (iv) o sono e a vigília; (v) a retenção e a expulsão (evacuação); e (vi) as paixões da alma (emoções). Na metade do século XIX, começaram a surgir evidências dos benefícios do exercício sobre a saúde em geral (Walker, 1840) e a associação negativa entre o exercício e a mortalidade precoce (Paffenbarger, Blair *et al.*, 2001). Em seguida, estas evidências despertaram o interesse em populações especiais, como os idosos e portadores de doenças crônicas ou derivadas do trabalho. Assim, a ginástica médica começou a ser utilizada no tratamento de doenças cardíacas crônicas em 1895 (Groedel, 1895), da tuberculose pulmonar e mielite em 1913 (Sylvan, 1913b; a) e da asma em 1950 (Ranke, 1950). A ginástica com objetivo terapêutico, ou cinesioterapia²⁰, utiliza exercícios globais com pouca exigência cardiovascular, sendo utilizada até hoje para aumentar a mobilidade e força muscular de modo geral (Figura 5, página 18), e prevenir os efeitos deletérios do leito prolongado ou de doenças que prejudicam os movimentos, como a própria DP. No início dos anos 1960, a demonstração da segurança de exercícios mais vigorosos aproximou

¹⁸ Hipócrates escreveu sobre o exercício físico: "Se pudéssemos dar a cada indivíduo a quantidade certa de nutrição e exercício físico, nem muito e nem pouco, nós teríamos encontrado o caminho mais seguro para a saúde."

¹⁹ Galeno de Pérgamo (131-200 A.C.) foi o mais destacado médico do período romano e o primeiro que conduziu pesquisas fisiológicas, inclusive do exercício, pois era médico da escola de gladiadores, especializando-se em cirurgia e dietética. A celebridade de Galeno era tal que antes de seu nome se escrevia "Cl", abreviação de *Clarissimus* (o muito célebre); em algum momento da história, por causa da ignorância a respeito do significado de Cl, lhe foi atribuído o prenome Claudius.

²⁰ Do Grego *kinesis*, movimento e *therapeia*, terapia. Auguste Georgi (1847) definiu cinesioterapia como "tratamento das doenças através do movimento". A cinesioterapia faz parte da fisioterapia moderna que utiliza o movimento provocado pela atividade muscular do paciente. Tem como objetivo prevenir, eliminar ou diminuir os distúrbios do movimento. É o que há muito tempo se chamou de ginástica médica em oposição à ginástica geral, cujos propósitos são essencialmente higiênicos ou estéticos.

definitivamente o exercício físico das ciências da saúde (Astrand, 1960; Dill e Consolazio, 1962). Desde então, houve um crescimento exponencial no interesse dos efeitos do exercício físico à saúde, e o surgimento de uma nova linha de investigação: a ‘biologia do exercício físico’. Hoje, são mais de 50.000 trabalhos disponíveis sobre este tema em bancos de dados como o *Pubmed* e a *Scopus* (Figura 4). E a condição “oposta”, o sedentarismo²¹, tornou-se um fator de risco estabelecido para muitas doenças, como a obesidade, a diabetes do tipo 2 e várias doenças arterio-vasculares (Berlin e Colditz, 1990; Knowler, Barrett-Connor *et al.*, 2002) (Figura 4). Mais recentemente, o sedentarismo tem sido sugerido como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Trejo, Carro *et al.*, 2002; Villar-Cheda, Sousa-Ribeiro *et al.*, 2009).

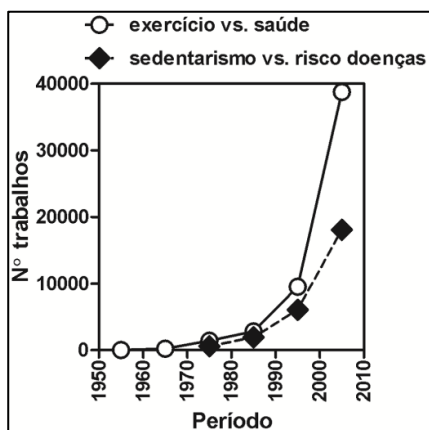


Figura 4. Número de trabalhos sobre exercício e sedentarismo disponíveis nas bases de dados Pubmed e Scopus. É evidente o crescente interesse nas últimas décadas sobre os efeitos do exercício físico à saúde, e da relação entre o sedentarismo e o risco de doenças. Fonte: Bases de dados Pubmed e Scopus.

O exercício físico induz alterações biológicas agudas e crônicas dependentes dos princípios de treinamento físico utilizado. Deste modo, nem todo exercício físico apresenta impacto no sedentarismo. Por exemplo, programas de cinesioterapia (Figura 5) pouco alteram a aptidão

²¹ Na antropologia evolucionária, sedentarismo é um termo aplicado à transição cultural da colonização nômade para uma condição permanente. Na transição para o sedentarismo, as populações seminômades possuíam um acampamento fixo para a parte sedentária do ano. O sedentarismo se tornou possível com novas técnicas agrícolas e pecuárias. O desenvolvimento do sedentarismo aumentou a agregação populacional e levou à formação de vilas, cidades e outras formas de comunidades. Recentemente, o sedentarismo ganhou outro significado, sendo definido como a falta/ausência/diminuição de atividades físicas ou esportivas, e até mesmo das atividades de tempo livre (ex: caminhar, jardinagem, limpar a casa). Considerada como a doença do século XXI, está associada ao comportamento cotidiano decorrente dos confortos da vida moderna. Pessoas que tem um gasto calórico reduzido semanalmente pela ausência da prática esportiva são consideradas sedentárias ou com hábitos sedentários.

cardiovascular dos indivíduos. Este impacto aumenta com o treinamento físico, principalmente o treinamento focado nas características aeróbias do exercício (Figura 5). Existem várias diferenças conceituais e operacionais entre a cinesioterapia e os exercícios aeróbios. A principal é o planejamento e a estruturação do programa de exercício físico com a utilização de princípios de treinamento, como a especificidade do gesto (ou tipo, ex.: andar, correr ou saltar), o volume (ou quantidade) e a intensidade (ou esforço) dos exercícios (revisado por Aguiar e Prediger, 2010), que apresentam várias semelhanças aos princípios posológicos utilizados na farmacologia. Como ilustrado na Figura 5, o objetivo do exercício é aumentar o consumo de oxigênio pelos tecidos ($\dot{V}O_2$), regulado pela capacidade máxima dos sistemas pulmonar e cardiovascular em captar e transportar o oxigênio ($\dot{V}O_{2max}$)²² (Bowen e Carmer, 1926; Lombardo, Rose *et al.*, 1953), assim como a capacidade dos tecidos em utilizá-lo na oxidação de substratos energéticos, principalmente lipídios e carboidratos (Havel, Naimark *et al.*, 1963; Young, Pelligra *et al.*, 1967). Galeno escreveu sobre o tema: “os movimentos que não alteram a respiração não podem ser chamados de exercício”. Isto é importante porque as características do treinamento físico, principalmente a intensidade, modulam as respostas alostáticas do organismo, dependentes também de fatores genéticos e do estado atlético atual do indivíduo (para revisão ver *American College of Sports Medicine Position Stand. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults*, 1998). O primeiro atleta a utilizar estes princípios de forma sistemática foi o tcheco Emil Zátopek (1922-2000, Figura 5) que registrou vários recordes mundiais de atletismo e ficou conhecido como a “locomotiva humana”²³.

²² $\dot{V}O_2 = Q \times dif_{av}O_2$. $Q = FC \times VS$. Logo, a capacidade de realizar esforços depende diretamente do Q e da $dif_{av}O_2$. Indivíduos treinados apresentam maior VS e atingem picos maiores de FC ao exercício, produzindo maiores valores de Q. Do mesmo modo, a musculatura treinada (e outros tecidos) remove mais oxigênio do sangue ao exercício, logo a $dif_{av}O_2$ é maior do que a de sedentários. Estas adaptações influenciam diretamente os valores de $\dot{V}O_2$, similares entre sedentários e sujeitos fisicamente ativos em repouso, mas bem maiores nestes últimos durante o exercício. Assim, o $\dot{V}O_{2max}$ de indivíduos treinados é maior do que o de sedentários, garantindo melhor tolerância a esforços máximos e submáximos. $dif_{av}O_2$ – diferença arteriovenosa de oxigênio. FC – frequência cardíaca. Q – débito cardíaco. VS – volume sistólico.

²³ Em 1952, Zátopek venceu as três provas mais desgastantes do atletismo na mesma semana: os 5.000 m, os 10.000 m e a maratona, nos jogos olímpicos de Helsinque (Finlândia). Em 31 de dezembro de 1953 Zátopek competiu na Corrida de São Silvestre (São Paulo). O corredor tcheco chegou ao primeiro lugar com facilidade, sob os aplausos dos brasileiros.

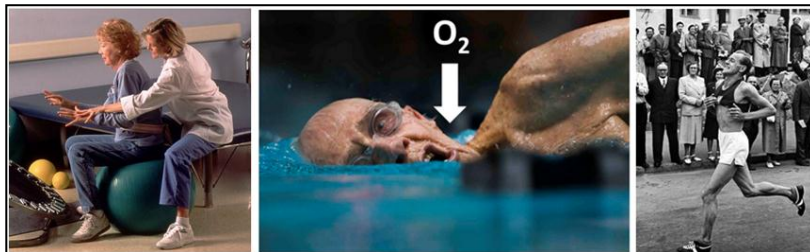


Figura 5. Exercício físico e cinesioterapia. Diferenças entre a cinesioterapia e o treinamento físico. A cinesioterapia (esquerda) objetiva a reabilitação do movimento em doenças que limitam a mobilidade do corpo. No treinamento físico (centro), o recrutamento de grandes grupos musculares aumenta a demanda por oxigênio. À direita, o tcheco Emil Zátopek. Figuras retiradas do *Google Imagens*.

Atualmente, a intensidade do exercício físico é facilmente controlada (ex.: $\dot{V}O_{2max}$ e limiar de lactato²⁴) para os mais diversos objetivos: recreativos e educacionais, atléticos, militares, estéticos, controle do peso corporal e reabilitação, entre outros (para revisão ver Haskell, Lee *et al.*, 2007). Hoje, as recomendações mínimas para promoção e manutenção da saúde incluem: (i) exercícios submáximos moderados (40-55% $\dot{V}O_{2max}$), duração mínima de 30 min diários, com frequência de cinco vezes por semana, ou (ii) exercícios mais fortes (55-65% $\dot{V}O_{2max}$), duração mínima de 20 min, três vezes por semana (Haskell, Lee *et al.*, 2007). A prática de exercícios em intensidade muito alta (>85% $\dot{V}O_{2max}$) pode levar à síndrome de supertreinamento (mais conhecido pelo termo em inglês *overtraining*), caracterizada por declínio do desempenho atlético acompanhado de prejuízos à saúde (Margonis, Fatouros *et al.*, 2007), inclusive ao SNC (Aguiar, Tuon *et al.*, 2008; Aguiar, Boemer *et al.*, 2010).

²⁴ Como consta no texto, a capacidade máxima de realizar exercício é limitada pela quantidade de energia que os músculos podem produzir através da oxidação de substratos energéticos. Ao nível celular, isto corresponde ao metabolismo mitocondrial do piruvato. Quando as mitocôndrias atingem o ponto máximo de conversão do lactato em piruvato (próximo ao limite máximo de exercício, ou $\dot{V}O_{2max}$), este último começa a acumular nos tecidos, inclusive no sangue, e pode ser medido facilmente com aparelhos chamados lactímetros, muitos deles portáteis. Deste modo, este limiar de lactato pode ser utilizado como uma medida indireta da intensidade do exercício.

Tabela 3. Estudos clínicos investigando os efeitos do exercício físico em pacientes Parkinsonianos.

H&Y	N	Intervenção	Desfecho	Referências
1-3	20	RML, 12 semanas, 2×/semana	↑ 16-18% RM, ↑ resistência muscular à fadiga, ↑ massa magra	(Hass, Collins <i>et al.</i> , 2007)
1,5-3	15	RML para membros inferiores e treino de equilíbrio com pistas visuais, 10 semanas, 3×/semana	↑ escores de orientação somato-sensorial, ≈ força muscular	(Hirsch, Toole <i>et al.</i> , 2003)
2-4	153	Exercícios domiciliares com pistas visuais	↑ 4,2-5,5% escores de postura e marcha	(Nieuwboer, Kwakkel <i>et al.</i> , 2007)
2,5-3	10	Esteira com suporte de 20% do peso corporal (BWSTT), quatro semanas	↓ escores UPDRS > fisioterapia convencional	(Miyai, Fujimoto <i>et al.</i> , 2000)
2-3	NI	Marcha e escadas, oito semanas, 3×/semana	↑ cinemática da marcha, ↓ quedas	(Protas, Mitchell <i>et al.</i> , 2005)
1-3	20	Musculação, esteira e bicicleta ergométrica, 12 semanas, 3×/semana	Hipertrofia de quadríceps no grupo exercício excêntrico	(Dibble, Hale <i>et al.</i> , 2006)

Continuação da Tabela 3				
H&Y	N	Intervenção	Desfecho	Referências
1,5-3	9	Marcha em esteira 80-90% velocidade confortável, seis semanas, 4×/semana	↑ 2,3-3% cinemática da marcha, ↓ sintomas motores (UPDRS), ↑ qualidade de vida (PDQ-39)	(Herman, Giladi <i>et al.</i> , 2007)
1-2	30	BWSTT, oito semanas, 3×/semana	↓ UPDRS, ↑ cinemática da marcha, ↓ hiperexcitabilidade córtico-motora (EMT)	(Fisher, Wu <i>et al.</i> , 2008)
2,5-3	52	Duas semanas de exercícios de “sentar e levantar” com pistas visuais e auditivas	↑ desempenho dos gestos de sentar e levantar, melhor no grupo com pistas	(Mak e Hui-Chan, 2008)
1-3	20	Ênfase no exercício excêntrico: musculação, esteira e bicicleta ergométrica, 12 semanas, 3×/semana	↑ qualidade de vida (PDQ-39) e força muscular, ↓ bradicinesia	(Dibble, Hale <i>et al.</i> , 2009)

BWSTT - *body weight supported treadmill training*; EMT - estimulação magnética transcraniana; H&Y - Hoehn & Yahr; NA - não se aplica; NI - não informado; PDQ-39 - *Parkinson's Disease Questionnaire* 39; RM - repetição máxima; RML - resistência muscular localizada; RR - risco relativo; UPDRS - *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*. ↑ - aumento. ↓ - diminuição.

Os programas de reabilitação moderna de doenças crônico-degenerativas vêm adicionando à cinesioterapia clássica os princípios do treinamento físico, visando atingir os benefícios extensamente relatados nos estudos experimentais. Isto ocorre inclusive com a DP, onde os efeitos paliativos e a segurança dos exercícios são conhecidos desde a década de 1950, para pacientes em diferentes estágios da doença, em protocolos terapêuticos que incluem exercícios para amplitude de movimento (ADM) e

flexibilidade, treinamento de equilíbrio e de marcha, mobilidade e coordenação (Nagera e Gnocchi, 1955; Bilowit, 1956; Clark, Clements *et al.*, 1956). Estas intervenções (ver Tabela 3) são usadas para aumentar a autonomia funcional (ex.: caminhar, subir/descer escadas, levantar da cadeira e da cama) e qualidade de vida dos pacientes, e/ou no diminuir os escores clínicos da DP (ex.: Hoehn & Yahr e UPDRS); através de intervenções em sequelas secundárias da doença, como a fraqueza e hipotrofia muscular, rigidez articular, e deformidades posturais (Doherty, Van De Warrenburg *et al.*, 2011). Mais recentemente, estratégias específicas de exercício foram desenvolvidas especificamente para os pacientes com DP, como: (i) o uso de pistas visuais, (ii) o suporte parcial do peso corporal (BWSTT), e o (iii) treinamento físico adaptado à DP (Tabela 3). Ainda que estes benefícios sejam valorosos, o impacto do exercício na DP ainda é considerado paliativo, sendo que os efeitos do exercício nos sintomas não motores da DP ou o seu potencial neuroprotetor permanecem incertos.

Os mecanismos envolvidos nestes benefícios começaram a ser descritos na última década (Smith e Zigmond, 2003; Petzinger, Walsh *et al.*, 2007), em modelos experimentais de Parkinsonismo utilizando duas neurotoxinas: a reativa DA na forma de 6-hidroxidopamina (6-OHDA)²⁵, e o inibidor complexo I mitocondrial MPTP (Figura 6). Ambas as neurotoxinas têm sido utilizadas com sucesso para o estudo de fenômenos bioquímicos, moleculares e comportamentais em modelos animais de Parkinsonismo. Embora escassas, a maioria destas evidências corroboram os resultados clínicos em relação aos benefícios do exercício aos prejuízos motores (Tabela 7, Apêndice I). Entretanto, ainda permanece controverso se estes benefícios são decorrentes de efeitos neuroprotetores e/ou paliativos, pois os resultados diferem em relação às duas neurotoxinas (Figura 6), e aos protocolos de exercício utilizados (Figuras 9 e 14). Além disso, os trabalhos experimentais envolvendo exercício físico também falham em duas necessidades ainda não atendidas da DP: o alívio dos sintomas não motores, e a modificação da doença e/ou neuroproteção.

²⁵ A 6-OHDA foi isolada originalmente por Senoh (1959) como um metabólito oxidativo da própria DA. Em 1963, Porter demonstrou que a 6-OHDA depletava a noradrenalina do SNC autônomo cardíaco (Stone, 1963), além de destruir terminais nervosos de neurônios simpáticos (Blum, Torch *et al.*, 2001). A 6-OHDA possui um radical hidroxila extra na posição 6 do anel catecol da molécula DA (destacado em vermelho na Figura 6), que acelera em 200 vezes a auto oxidação desta molécula de DA (Blum, Torch *et al.*, 2001).

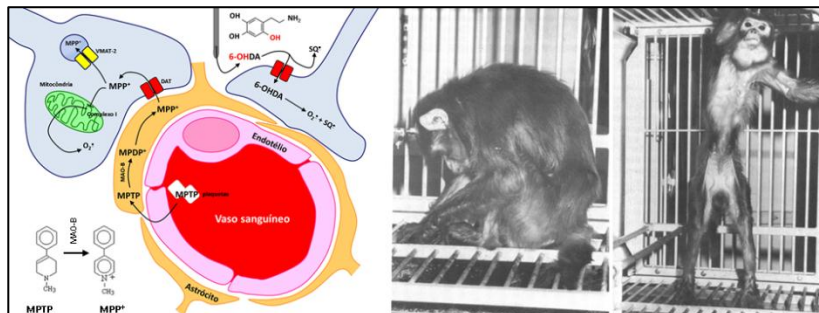


Figura 6. Neurotoxinas utilizadas no desenvolvimento de modelos experimentais da doença de Parkinson. À esquerda, alguns aspectos farmacológicos do MPTP e da 6-OHDA. No centro, a postura flexionada e acinética de um macaco tratado com MPTP, e a reversão deste comportamento à direita, após o tratamento com Sinemet (associação de 100 mg de L-DOPA e 10 mg de Carbidopa). Fonte: (Burns, Chiuheh *et al.*, 1983).

Entretanto, estes trabalhos iniciais refletem um quadro encorajador do papel antiparkinsoniano do exercício físico. As possíveis propriedades neuroprotetoras do exercício físico parecem não se restringir a DP, sendo também descritas na doença de Alzheimer (Lytle, Vander Bilt *et al.*, 2004; Solfrizzi, Capurso *et al.*, 2008). Entretanto, estas evidências são bem mais recentes para a DP, sendo que dois trabalhos epidemiológicos reforçam a hipótese neuroprotetora do exercício físico frente a esta doença. Um grande estudo acompanhou os hábitos de atividade física de 213.700 indivíduos durante 10 anos, e reuniu um conjunto de dados apontando o exercício físico como um agente neuroprotetor para a DP (Xu, Park *et al.*, 2010). Um estudo menor (10.714 participantes) já tinha observado uma evidência menos robusta no mesmo sentido (Logroscino, Sesso *et al.*, 2006). Entretanto, estas estimativas são sempre questionadas devido às limitações dos estudos epidemiológicos envolvendo exercício físico em grandes grupos, como o uso de auto-relatos de atividades cotidianas e atléticas (Logroscino, Sesso *et al.*, 2006; Xu, Park *et al.*, 2010). Neste sentido, a investigação experimental torna-se necessária para ampliar o conhecimento deste fenômeno.

Nestes trabalhos populacionais, a prevalência (proporção) e a incidência (novos casos) foram investigadas. É sabido que intervenção em um, pode influenciar o outro. Desde a introdução da L-DOPA, a incidência da DP manteve-se relativamente constante, embora a prevalência tenha aumentado (De Rijk, Launer *et al.*, 2000). Isto ocorreu simultaneamente ao aumento da sobrevida na DP causada pela própria L-DOPA (Hoehn e Yahr, 1967; Joseph, Chassan *et al.*, 1978), e ao fenômeno do envelhecimento

populacional²⁶. A Figura 7 mostra dados dos últimos três censos demográficos no Brasil. Os indivíduos com idade acima dos 65 anos representavam 5% da população em 2000, 11% em 2010, e representarão 18% em 2050. Isto reforça a necessidade de estratégias neuroprotetoras para as doenças associadas ao envelhecimento, como a DP. A desaceleração da história natural da DP pode simplificar o manejo dos sintomas motores e não motores, e transformar a DP em uma condição mais benigna, com impactos previsíveis na qualidade de vida e autonomia dos pacientes e de suas famílias. Entretanto, evidências sobre os efeitos do exercício em sintomas não motores da DP são escassos. Alguns trabalhos de revisão ou opinião têm sugerido de forma tímida e empírica sua utilidade no alívio dos sintomas não motores da DP (Fujimoto, 2009; Zesiewicz e Evatt, 2009). Entretanto, estas sugestões foram embasadas em sólidas evidências sobre o papel do exercício à saúde mental, em outras situações clínicas afora a DP (Nicholl, Coleman *et al.*, 1994; Lawlor e Hopker, 2001; Sjosten e Kivela, 2006).

A interação do exercício físico com os fármacos antiparkinsonianos também tem sido pouco explorada. A segurança desta interação foi investigada indiretamente em relação à L-DOPA (Tabela 3, todos os trabalhos envolvem exercício e pacientes tratados com este fármaco) e aos inibidores da COMT (Sundberg, Scheinin *et al.*, 1993; Lyytinen, Kaakkola *et al.*, 2002). A absorção intestinal da L-DOPA parece ser melhorada com o exercício (Reuter, Harder *et al.*, 2000; Lopane, Contin *et al.*, 2010), mas sem efeitos sobre sua eficácia clínica (Mouradian, Juncos *et al.*, 1987; Carter, Nutt *et al.*, 1992; Muhlack, Welnic *et al.*, 2007). A L-DOPA teve um impacto importante na funcionalidade e aumento da expectativa de vida dos pacientes com a DP. Entretanto, seus efeitos adversos limitam sua utilização em longo prazo, e intervenções que diminuam estes efeitos adversos são importantes para a independência e qualidade de vida dos pacientes com a DP. Nesta tese, o papel antidiscinético do exercício foi investigado, fundamentado em dois fatores. Primeiro, observamos recentemente que o exercício físico de longa duração diminuiu a ativação da DARPP-32 estriatal (Aguiar, Boemer *et al.*, 2010), um dos mecanismos propostos para o desenvolvimento das discinesias induzidas pela L-DOPA. Segundo, o avanço da neurodegeneração é um fator de risco para o desenvolvimento das discinesias (Carlsson, Carta *et al.*, 2007; Calabresi, Di Filippo *et al.*, 2010), logo, se confirmado o papel neuroprotetor do exercício, isto pode reduzir ou inibir as discinesias induzidas pela L-DOPA.

²⁶ A Organização das Nações Unidas (ONU) estabeleceu que a “era do envelhecimento” teve início em 1975 e que essa tendência deverá se estender por mais cinquenta anos, isto é, até 2025.

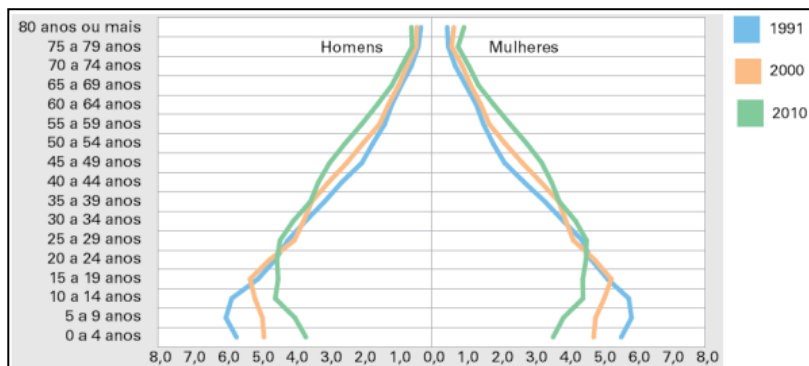


Figura 7. Censo Brasil sobre a idade da população brasileira por faixa etária 1991-2010. O número de idosos brasileiros vem crescendo exponencialmente nas últimas duas décadas. Fonte: Censo demográfico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 1991/2010.

Mais recentemente, o modelamento experimental de sintomas não motores da DP (Prediger, Batista *et al.*, 2006; Tadaiesky, Dombrowski *et al.*, 2008; Prediger, Aguiar *et al.*, 2010) e das discinesias induzida pela L-DOPA (Winkler, Kirik *et al.*, 2002; Lundblad, Picconi *et al.*, 2004), utilizando a 6-OHDA e o MPTP em roedores, permitiu avanços no conhecimento destes temas. A proposta desta tese é investigar o impacto de uma manipulação ambiental não farmacológica – exercício físico – em modelos experimentais de Parkinsonismo – camundongos tratados com 6-OHDA ou MPTP –, nas três fases da DP: (i) estágio pré-clínico, com prevalência de prejuízos não motores; (ii) estágio clínico, com prevalência de prejuízos motores; e (iii) estágio avançado, com prevalência de discinesias induzida pela L-DOPA. Esses modelos permitem a investigação de fatores etiopatológicos (ex.: disfunção mitocondrial) e alterações comportamentais (ex.: hiposmia e prejuízos cognitivos e motores) verificados na DP (Dauer e Przedborski, 2003; Dawson, Ko *et al.*, 2010; Prediger, Aguiar *et al.*, 2011). Para melhor avaliar as possíveis propriedades neuroprotetoras do exercício nos modelos de Parkinsonismo, assim como evitar o viés de seus conhecidos efeitos paliativos (Tabela 7, Apêndice I), os animais foram submetidos ao exercício físico antes dos tratamentos com 6-OHDA ou MPTP; ou durante o tratamento com L-DOPA, na avaliação das discinesias. Anteriormente, este mesmo desenho mostrou-se eficaz na prevenção de prejuízos motores e cognitivos em ratos reserpinizados, mas isentos de processo neurodegenerativo (Aguiar, Araujo *et al.*, 2009). Deste modo, os seguintes objetivos foram desenhados:

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo principal desta tese foi investigar o potencial do exercício físico como um agente modificador do Parkinsonismo, e das discinesias induzidas pelo tratamento com L-DOPA, através da utilização de modelos experimentais em camundongos.

2.2. Objetivos específicos

Investigar as modificações atléticas induzidas pelo exercício em esteira ergométrica e em rodas de correr em camundongos, através das medidas da quantidade de exercício (distância e velocidade de corrida), respostas agudas ao exercício pelo lactato sanguíneo, e adaptações mitocondriais musculares ao exercício total.

Investigar os efeitos do exercício sobre a neurodegeneração e o estresse oxidativo da via dopaminérgica nigro-estriatal induzidos pelas neurotoxinas 6-OHDA e MPTP, avaliados pelos níveis de DA e metabólitos no estriado e bulbo olfatório, captação estriatal de DA, imunodeteção da enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado e *SNpc*, níveis estriatais de H_2O_2 e defesas antioxidantes, e pelas respostas de hipotermia.

Investigar os efeitos do exercício nos prejuízos sensoriais, cognitivos e motores induzidos pelas neurotoxinas 6-OHDA e MPTP, avaliados através dos testes comportamentais de discriminação olfatória, medo pareado ao som e contexto, labirinto aquático de Morris, rota-rod, cilindro, e campo aberto.

Investigar os efeitos do exercício nas alterações de sensibilidade dos receptores dopaminérgicos após neurodegeneração induzida pela 6-OHDA e MPTP, avaliadas nos desafios farmacológicos com R(-)-apomorfina para medir rotações e comportamento de escalada, com haloperidol para catalepsia, (-)-quinpirole para locomoção, e L-DOPA para discinesias.

Investigar o efeito do exercício na inibição do complexo I mitocondrial induzido pelas neurotoxinas MPP^+ e rotenona em mitocôndrias isoladas do cérebro dos camundongos.

Investigar os efeitos do exercício nas alterações de sinalização intracelular no estriado induzidas pela L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos, medidas pela liberação de glutamato, fosforilação da proteína DARPP-32, níveis de cdk5 e cFos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 (5-6 meses, 25-30 g) de uma colônia de expansão (3ª geração, irmão/irmã) do biotério do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais da colônia de produção (1ª geração) foram obtidos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Universidade de Campinas (UNICAMP) originários do *Zentralinstitut für Versuchstierzucht* (ZVZ, Instituto Central de Melhoramento Animal, Hannover, Alemanha). Os filhotes foram desmamados com três semanas, e a sexagem foi realizada com seis semanas de idade, sendo os animais agrupados em gaiolas plásticas retangulares (49 x 34 x 16 cm) em número máximo de 15 animais por gaiola. Os animais foram mantidos em gabinetes climatizados a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 h (fase clara 7:00-19:00 h) livre acesso à água e ração. Foram utilizados grupos independentes de animais para os experimentos comportamentais e desafios farmacológicos. Os animais utilizados nos experimentos bioquímicos não receberam nenhum tratamento farmacológico, exceto para a indução experimental do Parkinsonismo e das discinesias induzidas pela L-DOPA. Todos os procedimentos desta tese estão de acordo com os padrões éticos e legais de experimentação animal de Órgãos internacionais [(i) guia para cuidado e uso de animais de laboratório do *National Institute of Health* e (ii) Diretiva 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° PP00357 de 26/06/2009.

3.2. Drogas

Este trabalho utilizou manipulação farmacológica para três objetivos: (i) modelagem experimental do Parkinsonismo, (ii) desafios comportamentais à supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos frente à neurodegeneração dopaminérgica; e, (iii) estudo da função mitocondrial. Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich®. As neurotoxinas utilizadas para a indução do Parkinsonismo experimental estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4. Neurotoxinas utilizadas no presente estudo.

Neurotoxina	Dose / concentração	Ação
Cloridrato de 6-hidroxidopamina (6-OHDA)	4 e 6 µg intra-estriatal (Bensadoun <i>et al.</i> , 2000; Santini <i>et al.</i> , 2007)	Neurotoxina para neurônios catecolaminérgicos (Mendez e Finn, 1975)
Cloridrato de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)	65 mg/kg, i.n. (Prediger, Aguiar <i>et al.</i> , 2010)	Neurotoxina para neurônios dopaminérgicos (Langston <i>et al.</i> , 1983)
Rotenona	5 µM	Inibidor da atividade do complexo I mitocondrial (Gutman <i>et al.</i> , 1969)
Iodeto de 1-metil-4-fenilpiridina (MPP ⁺)	0,02; 0,5 e 2,5 mM	Metabólito ativo do MPTP, inibidor da atividade do complexo I mitocondrial (Langston <i>et al.</i> , 1984)

Os tratamentos com agonistas e antagonistas dopaminérgicos foram padronizados a partir de curvas pilotos baseadas em trabalhos prévios da literatura (Lau e Fung, 1986; Weihmuller, Hadjiconstantinou *et al.*, 1990; Sporeen, Vassout *et al.*, 1998; Hille, Fox *et al.*, 2001; Mihara, Mihara *et al.*, 2007; Morelli e Wardas, 2001; Cooper, Bloom *et al.*, 2003; Lundblad, Picconi *et al.*, 2004; 2005; Goldberg, Pisani *et al.*, 2005; Houchi, Babovic *et al.*, 2005; Pavon, Martin *et al.*, 2006). As drogas 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. As drogas, as doses utilizadas e seus mecanismos de ação estão listados na Tabela 5.

Devido à natureza oxidante da 6-OHDA e da R(-)-apomorfina, o metabissulfito de sódio 0,1% (Na₂S₂O₅) em solução livre de oxigênio foi usado como veículo. Para o haloperidol, foi usado como veículo dimetilsulfóxido (DMSO 10% v/v) e Tween-80 (0,1% v/v). A rotenona e o MPP⁺ foram solubilizados em um tampão respiração 50 mM [0,3 M de sacarose, 5 mM de ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico (MOPS), 1 mM de ácido etileno glicol-bis (β-amino-etil-éter) (EGTA), albumina de soro bovino 0,1%, pH 7,4). O veículo da solução de L-DOPA e benserazida foi tampão fosfato (4 mM KH₂PO₄, 16 mM Na₂HPO₄, 115 mM NaCl,

pH 7,4). Para as outras drogas foi utilizada a solução salina (NaCl 0,9%) como veículo.

Tabela 5. Drogas utilizadas no presente estudo.

Droga	Dose	Ação
Cloridrato de R(-)-apomorfina	0,2 e 0,6 mg/kg, s.c.	Agonista não seletivo dos receptores para DA
Haloperidol	0,32 mg/kg, i.p.	Antagonista preferencial dos receptores D ₂ para DA
Cloridrato de (-)-quinpirole	10 ⁻³ , 10 ⁻² , 10 ⁻¹ e 1 mg/kg, i.p.	Agonista dos receptores D ₂ e D ₃ para DA
Cloridrato do éster metílico de L-3,4-dihidroxifenilalanina	25 mg/kg, i.p.	Precursor da L-DOPA
Cloridrato de benserazida	12,5 mg/kg, i.p.	Inibidor periférico da enzima descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos
Cloridrato de amantadina	40 mg/kg, i.p.	Antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA

3.3. Desenhos experimentais

3.3.1. Experimento 1 – 6-OHDA versus exercício.

O desenho experimental 1 ilustrado na Figura 8 foi utilizado para testar a hipótese neuroprotetora do exercício físico frente aos (i) prejuízos motores, (ii) supersensibilidade de receptores dopaminérgicos, e (iii) neurodegeneração induzida pela administração intra-estriatal de 6-OHDA em camundongos.

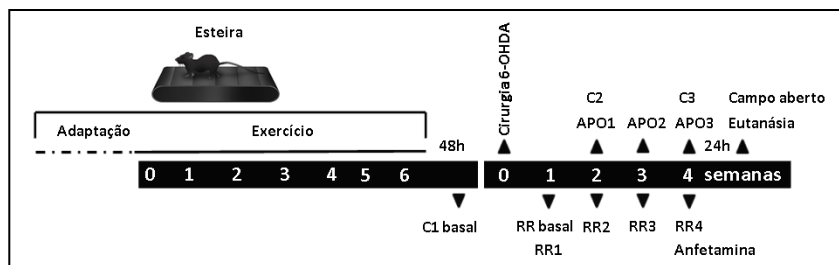


Figura 8. Desenho experimental 1: 6-OHDA versus exercício. APO – R(-)-apomorfina; C – cilindro; RR – rota-rod.

Como descrito anteriormente, o protocolo de exercício foi realizado antes do tratamento com 6-OHDA, para evitar os bem estabelecidos efeitos paliativos do exercício nestas tarefas comportamentais (Tabela 7, Apêndice I). Uma esteira ergométrica foi adaptada para simular o exercício de corrida em camundongos, conforme Figura 9 ([link](#) para vídeo). O exercício, volume semanal e intensidade de corrida (Figura 9) foram padronizados durante a fase escura do ciclo dos animais (após 19:00 h), de acordo com protocolos previamente estabelecidos na literatura para esta linhagem de camundongos (Tillerson, Caudle *et al.*, 2003; Fisher, Petzinger *et al.*, 2004; Petzinger, Walsh *et al.*, 2007; Aguiar, Tuon, *et al.*, 2008; Gorton, Vuckovic *et al.*, 2010). 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.

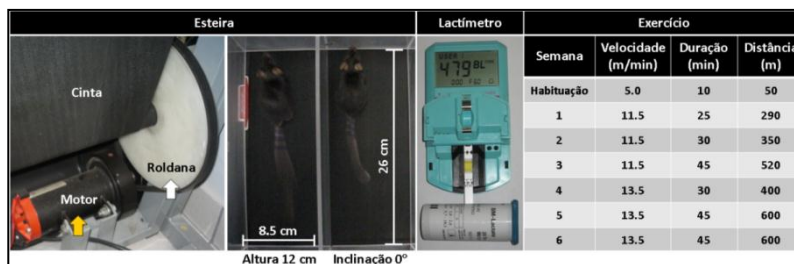


Figura 9. Esteira ergométrica adaptada para camundongos. A polia (seta branca) e o motor (seta amarela) da esteira foram modificados para permitir velocidade mínima de 5 m/min, e a esteira foi nivelada horizontalmente (esquerda, vista de baixo). Foi anexado um aparato de acrílico com 12 baias individuais (centro, vista de cima). Ao centro, o lactímetro com a fita para medida aguda dos níveis de lactato sanguíneo. À direita, o protocolo de exercício adotado teve caráter progressivo, pois o volume e a intensidade de corrida foram aumentados semanalmente, utilizando de critérios de treinamento físico.

Os níveis agudos de lactato sérico [(25-50 μ l da cauda, lactímetro Accutrend®, Roche, Basel, Suíça) Figura 9] foram medidos semanalmente para controle e ajuste do treinamento físico dos animais. Após as seis semanas de exercício físico, o músculo *quadriceps femoris* de ambas as patas traseiras de animais sedentários e exercitados foram removidos, para o isolamento de mitocôndrias e a análise da atividade do ciclo de Krebs e da cadeia transportadora de elétrons, da matriz e crista mitocondriais, respectivamente.

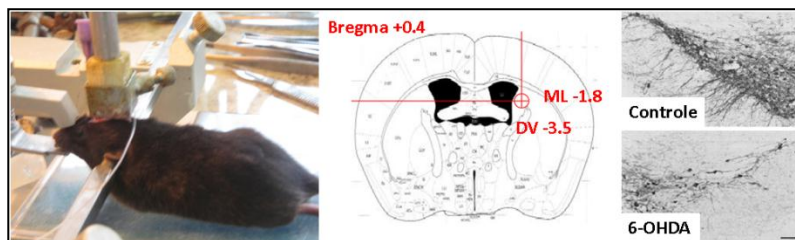


Figura 10. Administração intra-estriatal de 6-OHDA. Um animal anestesiado posicionado no estereotáxico para receber a administração de 6-OHDA (esquerda), no médio-estriado (meio). À direita, a redução na marcação para tirosina hidroxilase na *substantia nigra* dos animais tratados com 6-OHDA após quatro semanas da cirurgia (Bensadoun, Deglon *et al.*, 2000).

A administração intra-estriatal de 6-OHDA foi realizada 48 h após a última sessão de exercício através de cirurgia estereotáxica (Figura 10). Os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, i.p.) e receberam uma única injeção (2 μ l, 0,5 μ l/min) de 6-OHDA (2 μ g/ μ l) no estriado direito utilizando as seguintes coordenadas: AP +0,4 mm, ML -1,8 mm, DV -3,5 mm (Bensadoun, Deglon *et al.*, 2000). Os animais do grupo controle passaram pelos mesmos procedimentos e receberam volume equivalente da solução veículo. Ao final destes procedimentos, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: (i) sedentário + veículo, (ii) sedentário + 6-OHDA, (iii) exercício + veículo, e, (iv) exercício + 6-OHDA.

Após uma semana de recuperação cirúrgica, os animais foram submetidos a uma bateria de tarefas comportamentais (Figura 8), e depois foram sacrificados por deslocamento cervical ao final dos experimentos, para dissecação do estriado e armazenagem a -80°C para a realização dos ensaios bioquímicos, ou foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e quetamina 100 mg/kg, i.p.) e perfundidos com paraformaldeído 4% para os ensaios de imuno-histoquímica.

3.3.2. Experimento 2 – MPTP versus exercício.

O desenho experimental 2 ilustrado na Figura 11 foi utilizado para testar a hipótese neuroprotetora do exercício físico frente aos (i) prejuízos cognitivos, (ii) supersensibilidade de receptores dopaminérgicos, e (iii) neurodegeneração induzida pela administração intranasal de MPTP. O protocolo de exercício foi o mesmo utilizado no experimento anterior. O tratamento intranasal com MPTP foi realizado 48 h após a última sessão de exercício.

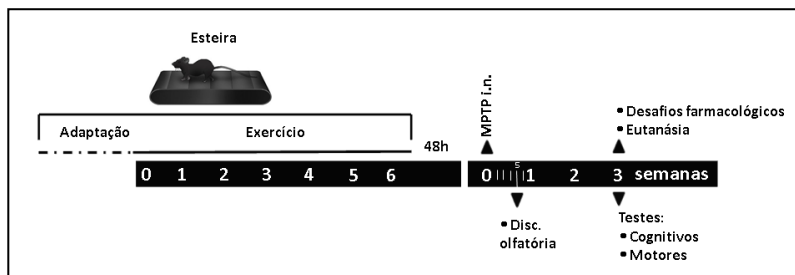


Figura 11. Desenho experimental 2: MPTP versus exercício. Os animais foram exercitados durante seis semanas, depois foram tratados com MPTP pela via intranasal e submetidos à discriminação olfatória após cinco dias. Após três semanas, os animais foram avaliados numa bateria de tarefas comportamentais sendo em seguida sacrificados para os estudos neuroquímicos.

Após o relato de intoxicações acidentais (Wright, Wall *et al.*, 1984; Langston e Palfreman, 1995), tem sido demonstrado que a via intranasal representa uma eficiente via para a administração de MPTP e indução de Parkinsonismo experimental em roedores (Dluzen e Kefalas, 1996; Prediger, Batista *et al.*, 2006; Rojo, Montero *et al.*, 2006; Moreira, Rial *et al.*, 2010). O protocolo de administração utilizado foi adaptado do método original desenvolvido em nosso laboratório (Prediger, Aguiar *et al.*, 2010; Prediger, Aguiar *et al.*, 2011). Neste caso, foram utilizados camundongos de 6 meses de idade para aumentar a sensibilidade ao MPTP (Gupta, Gupta *et al.*, 1986; Ricaurte, Irwin *et al.*, 1987; Liu, Wang *et al.*, 2010). Os camundongos, livres de anestesia, receberam três administrações de MPTP em ambas as narinas (10,5-19,6 μl /narina de solução 20 mg/ml), separados por intervalos 1 min para cada narina, e 3 h entre cada administração, totalizando a dose 65 mg/kg. O tratamento foi realizado através de um tubo de polietileno (PE-10) inserido 3-4 mm nas narinas dos animais, com taxa de infusão de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (Figura 12) ([link](#) para vídeo). Os animais controle receberam a mesma manipulação com veículo. Ao final destes procedimentos, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: (i) sedentário + veículo, (ii) sedentário + MPTP, (iii) exercício + veículo, e, (iv) exercício + MPTP.

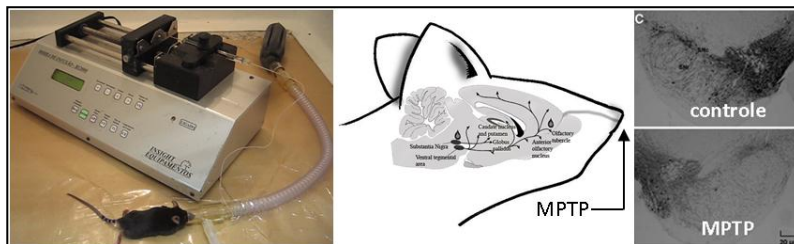


Figura 12. Administração intranasal de MPTP. À esquerda, a administração intranasal é realizada através de um tubo de polietileno PE10 conectado a uma microseringa e uma bomba de infusão. Esta via permite o acesso de substâncias ao sistema nervoso central via nervo olfatório e facial (meio), sendo que o tratamento com MPTP pela via intranasal diminui o número de neurônios TH+ na *substantia nigra* de camundongos C57BL6 (direita) (Prediger, Aguiar *et al.*, 2010).

Após a avaliação em tarefas comportamentais (Figura 11), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, para dissecação do estriado, e armazenagem a -80°C para a realização dos experimentos bioquímicos.

3.3.3. Experimento 3 – Discinesias induzidas pela L-DOPA versus exercício.

O desenho experimental 3 ilustrado na Figura 13 foi utilizado para testar os efeitos antidiscinéticos do exercício físico em camundongos hemi-parkinsonianos tratados cronicamente com L-DOPA.

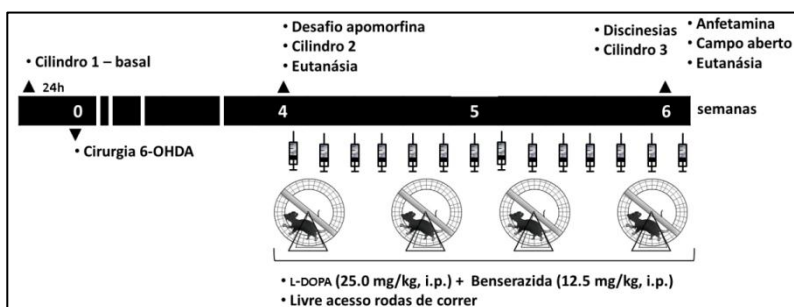


Figura 13. Desenho experimental 3: discinesias induzidas pela L-DOPA versus exercício.

O protocolo experimental utilizado para modelar as discinesias induzidas pela L-DOPA foi baseado em trabalhos prévios da literatura (Pavon, Martin *et al.*, 2006; Santini, Valjent *et al.*, 2007) ([link](#) para vídeo). Os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/kg e quetamina

100 mg/kg, i.p.) e receberam duas injeções tópicas (2 x 2 μ l, 0,5 μ l/min) de 6-OHDA (3 μ g/ μ l) 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 por mais duas semanas, uma administração diária de L-DOPA (1 x 25 mg/kg, i.p.) e benserazida (1 x 12,5 mg/kg, i.p.) na mesma seringa. Deste modo, todos os animais foram submetidos à cirurgia e ao tratamento com L-DOPA/benserazida. Durante este período, os animais foram isolados em gaiolas com livre acesso à (i) rodas de correr (modelo *Silent Spinner*, Pets International, Grove Village IL, EUA) ([link](#) para vídeo) ou à (ii) rodas bloqueadas, para evitar viés de enriquecimento ambiental (Figura 14). Deste modo, foi possível construir dois grupos experimentais: (i) 6-OHDA + L-DOPA/benserazida + controle, e, (ii) 6-OHDA + L-DOPA/benserazida + exercício voluntário em rodas de correr.



Figura 14. Rodas de correr e as discinesias induzidas pelo tratamento com L-DOPA. À esquerda, uma gaiola com acesso livre à roda de correr com contador de velocidade e distância. O controle do viés ambiental foram rodas bloqueadas, que permitiam interação com o aparato (centro). O tratamento com L-DOPA (25 mg/kg e benserazida 12,5 mg/kg, i.p.) durante duas semanas induziu discinesias motoras orofaciais (seta verde), de membros (seta amarela) e de rotação de tronco (seta branca) (direita).

As discinesias foram avaliadas após duas semanas de tratamento com L-DOPA/benserazida, e outros paradigmas comportamentais foram testados no período 4-6 semanas após a cirurgia (Figura 13). Após seis semanas da lesão intra-estriatal com 6-OHDA, os animais foram sacrificados após 30 min da última injeção combinada de L-DOPA/benserazida, e os estriados foram dissecados. Neste momento, também foi removido o músculo *quadriceps femoris* de ambas as patas traseiras para o isolamento de mitocôndrias e a análise da atividade do ciclo de Krebs e da cadeia transportadora de elétrons.

3.4. Experimentos 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 (10:00-17:00 h). Após cada experimento, o aparato era limpo com EtOH 10%. Todos os experimentos foram registrados em vídeo e analisados na plataforma ANY-maze™ *video tracking system* (Stoelting Co., Wood Dale IL, EUA).

3.4.1. Discriminação olfatória

A discriminação olfatória é uma tarefa de avaliação da capacidade olfatória de roedores na discriminação entre um ambiente familiar e um não familiar, sendo que esta capacidade de discriminação olfatória é prejudicada pelo tratamento intranasal com MPTP (Prediger, Batista *et al.*, 2006; Moreira, Rial *et al.*, 2010; Prediger, Aguiar *et al.*, 2010). Para isto, os animais foram isolados após o tratamento intranasal com MPTP durante 72 h antes da realização da tarefa, para impregnação do odor individual dos animais na serragem. A caixa de discriminação olfatória consiste em dois compartimentos idênticos (26 x 8,5 x 16 cm) (Figura 15, página 37), separados por um acesso livre, sendo um forrado com serragem limpa (compartimento não familiar) e outro com a serragem da gaiola onde o animal permaneceu isolado (compartimento familiar). A discriminação olfatória foi avaliada pela taxa de investigação entre os dois compartimentos durante 5 min, e pelo padrão de ocupação dos ambientes. Também foi avaliado o deslocamento dos animais para controle motor do experimento.

3.4.2. Respostas de medo condicionado

O medo condicionado é um condicionamento pavloviano de um estímulo neutro (EN) (ex.: ambiente, sinal sonoro ou luminoso) pareado a um estímulo incondicionado (EI) aversivo (ex.: choque elétrico) (Grillon, 2002; Knafo, Venero *et al.*, 2009). No presente trabalho foram utilizados dois EI: (i) estímulos sonoro, ou (ii) o ambiente (contexto), e um EI: (iii) choque elétrico nas patas. Deste modo, a aprendizagem e memória puderam ser avaliadas através do medo condicionado ao (i) som e (ii) ao contexto, através dos comportamentos de congelamento dos animais.

Vuckovic, Wood *et al.* (2008) demonstraram que camundongos tratados sistemicamente com MPTP apresentam prejuízos ao medo condicionado ao som. Portanto, utilizamos esta tarefa para avaliar os

possíveis benefícios cognitivos do exercício após três semanas do tratamento intranasal com MPTP (Figura 11, página 32). Os camundongos foram posicionados no aparato A (Figura 15) durante 2 min, seguido pelo condicionamento através de três pares do conjunto som-choque. Foram utilizados três pares de estímulos sonoros (5 s, 80 dB, 4 kHz) finalizados de modo simultâneo a choques elétricos [(2 s, 0,5 mA) nas patas dos animais (gerador modelo EEF 342, Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP) em intervalos de 1 min (Knafo, Venero *et al.*, 2009; Aguiar, Boemer *et al.*, 2010). Após o último choque elétrico, os animais permaneceram no aparato por mais 1 min, e depois retornaram às suas gaiolas. Na sessão de teste, realizada 24 h após o condicionamento, os animais foram colocados em uma caixa diferente (aparato B) com as mesmas dimensões da anterior (aparato A), em uma sala de experimento diferente daquela utilizada durante a sessão de condicionamento. Após 2 min, os animais receberam a estimulação sonora com a mesma configuração da sessão de condicionamento, mas com ausência do estímulo elétrico.

O condicionamento ao contexto foi utilizado como experimento controle para as respostas de congelamento. O protocolo utilizado foi semelhante ao condicionamento ao som, exceto pelas ausências de estímulos sonoros, e as sessões de condicionamento e teste foram realizadas no mesmo contexto: aparato (A) e sala de experimentação. Ambos os experimentos foram analisados através da plataforma ANY-maze™ para obtenção do tempo (s) das respostas de congelamento.

3.4.3. Labirinto aquático

Num trabalho pioneiro, Morris *et al.* (1982) condicionaram ratos a navegar até uma plataforma submersa em um tanque preenchido com água usando pistas visuo-espaciais. A manipulação da localização/visualização desta plataforma permite a avaliação de diferentes tipos de memórias, como a espacial, a operacional e a de procedimento (Terry, 2009). Já foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa que o tratamento intranasal com MPTP prejudica o aprendizado das memórias operacional e de procedimento no labirinto aquático em roedores (Prediger, Batista *et al.*, 2006; Prediger, Aguiar *et al.*, 2010). Nesta tese, utilizamos a versão de memória operacional do labirinto aquático para avaliar os possíveis benefícios cognitivos do exercício físico após três semanas do tratamento intranasal com MPTP (Figura 11, página 32).

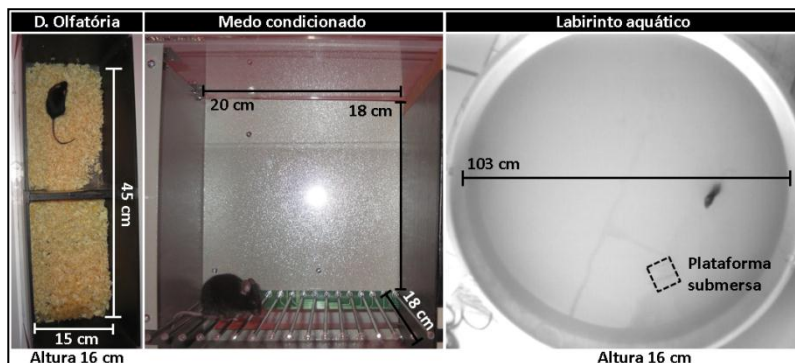


Figura 15. Tarefas para avaliação sensorial (esquerda) e cognitiva (centro e direita). D – discriminação.

O labirinto aquático utilizado neste estudo é circular (Figura 15) e foi preenchido com 50-60 cm³ de água turva (através do uso de leite em pó), temperatura ambiente, onde os animais foram condicionados a encontrar uma plataforma de escape (10 x 10 cm) submersa 0,5 cm da superfície. A navegação foi orientada espacialmente por quatro pistas visuais equidistantes (50 x 50 cm) fixadas nas paredes da sala de experimento (NO, NE, SO e SE), 30 cm acima da borda do tanque. Os animais foram submetidos a 4 dias de teste, com 4 sessões diárias de condicionamento. Os quatro pontos de partida (N, S, L e O) foram distribuídos randomicamente em cada dia, sendo utilizado apenas 1 vez/dia. A posição da plataforma permaneceu fixa durante as 4 sessões do dia, sendo alterada no dia seguinte, no centro de um quadrante diferente dos dias anteriores. As sessões de treinamento foram de no máximo 60 s, com 30 s de permanência na plataforma, de onde os animais retornavam imediatamente para o próximo ponto de partida. Nas falhas em encontrar a plataforma, os animais foram gentilmente guiados até a mesma. Estes procedimentos foram utilizados para garantir a informação visuo-espacial do labirinto durante a execução da tarefa (Aguiar, Boemer *et al.*, 2010; Prediger, Aguiar *et al.*, 2010).

O controle da acuidade visual dos animais foi realizado no 5º dia, através de três sessões de teste, quando a plataforma submersa foi sinalizada por uma pista visual (no caso, uma bola de pingue-pongue) (Meshi, Drew *et al.*, 2006; Aguiar, Boemer *et al.*, 2010). A latência de escape (s) e a velocidade de nado (m/min) das cinco sessões no labirinto aquático (operacional e visual) foram avaliadas através da plataforma ANY-maze™.

3.4.4. Rota-rod

O sistema de rota-rod (Figura 16, modelo EEF 412, Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, SP) avalia a coordenação motora e equilíbrio de roedores sobre um cilindro em rotação (Jiang, Wan *et al.*, 2004; Petzinger, Walsh *et al.*, 2007; Aguiar, Araujo *et al.*, 2009) ([link](#) para vídeo). Após uma semana do tratamento intra-estriatal com 6-OHDA, os animais do experimento 1 foram condicionados no cilindro estacionário (zero RPM) durante 30 s, seguido pelo cilindro a 5 RPM constante durante 90 s (Jiang, Wan *et al.*, 2004). Os animais com número de quedas superior a três foram descartados das sessões de teste (8% dos animais). Após 30 min, os animais selecionados foram testados em duas sessões diárias, com intervalos de 30 min, na versão acelerada do rota-rod, velocidade inicial 5 RPM e aceleração 0,1 revolução/s (Jiang, Wan *et al.*, 2004). Os mesmos animais foram retestados duas, três e quatro semanas após a cirurgia (Figura 8, página 29).

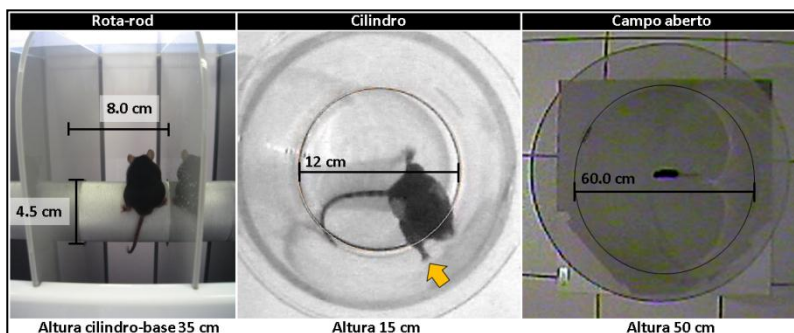


Figura 16. Tarefas para avaliação da coordenação motora (esquerda), assimetria (centro) e locomoção (direita). A seta amarela mostra a assimetria contralateral ao lado lesionado com 6-OHDA. Os animais com administração de 6-OHDA no estriado direito, apresentam menor apoio da pata dianteira esquerda na parede do cilindro.

3.4.5. Cilindro

O teste do cilindro (Figura 16) é utilizado para avaliar assimetria de apoio das patas dianteiras após lesões unilaterais em núcleos motores do SNC (Mabandla e Russell, 2010; Tajiri, Yasuhara *et al.*, 2010) ([link](#) para vídeo). Os animais foram colocados dentro de um cilindro transparente para registro dos contatos das patas dianteiras à parede do cilindro durante 3 min (Schallert e Woodlee, 2003). O escore do cilindro foi calculado como viés contralateral (Roof, Schielke *et al.*, 2001). Foi controlado o valor basal de

cada animal (antes da cirurgia), e os animais foram retestados duas e quatro semanas (Figura 8, página 29) após a cirurgia para o experimento 1, e quatro e seis semanas após a cirurgia para o experimento 3 (Figura 13, página 33). Os eventos foram registrados em vídeo e analisados em câmera lenta na velocidade 0,5x.

3.4.6. Campo aberto

O campo aberto foi utilizado para determinar a atividade locomotora dos animais (Basso, Beattie *et al.*, 1995). Este teste foi realizado durante 10 min de livre exploração em uma arena circular (Figura 16), após quatro (experimento 1, Figura 8, página 29) ou seis semanas (experimento 3, Figura 13, página 33) da administração intra-estriatal de 6-OHDA, ou após 3 semanas do tratamento intranasal com MPTP (experimento 2, Figura 11, página 32). A distância percorrida (m) e a velocidade média (m/min) foram avaliadas através da plataforma ANY-maze™.

3.5. Desafios farmacológicos

3.5.1. Alterações locomotoras induzidas por (-)-quinpirole

Foi construída uma curva dose-resposta dos efeitos do (-)-quinpirole (agonista dos receptores D₂ para DA) sobre a atividade locomotora dos animais, através da administração via i.p. nas doses de 1, 10, 10² e 10³ µg/kg baseadas em literatura anterior (Goldberg, Pisani *et al.*, 2005; Houchi, Babovic *et al.*, 2005) 15 min antes da exposição ao campo aberto quadrangular (50 x 50 x 40 cm), sendo que a distância percorrida (m) e a velocidade média (m/min) dos animais durante 15 min foram avaliadas através da plataforma ANY-maze™.

3.5.2. Comportamento de escalada induzida por R(-)-apomorfina

Trabalhos prévios têm demonstrado um aumento da sensibilidade dos receptores pós-sinápticos para DA após tratamento sistêmico com MPTP através da avaliação do comportamento de escalada (“climbing”) induzido pela R(-)-apomorfina (Lau e Fung, 1986; Spooen, Vassout *et al.*, 1998). Neste trabalho, este paradigma foi utilizado para avaliar o efeito neuroprotetor do exercício físico, após três semanas do tratamento intranasal com MPTP (Figura 11, página 32). O comportamento de escalada induzido pela R(-)-apomorfina foi realizado como descrito por Protais (1976). Resumidamente, os animais foram individualmente habituados a

uma caixa metálica (Figura 17) com paredes de barras de metal (\varnothing 2 mm, 1 cm de distância) durante 60 min, e o comportamento de escalada foi avaliado por 60 min após o tratamento com a R(-)-apomorfina (0,2 mg/kg, s.c.). Durante este período, o comportamento de escalada foi registrado manualmente em intervalos de 5 min utilizando o seguinte escore proposto por Spooren, Vassout *et al.* (1998): 0 – as quatro patas no chão, 1 – as duas patas dianteiras segurando as barras, e 2 – as quatro patas segurando barras. A pontuação acumulada ao longo de 60 min foi utilizada para quantificação do comportamento de escalada.

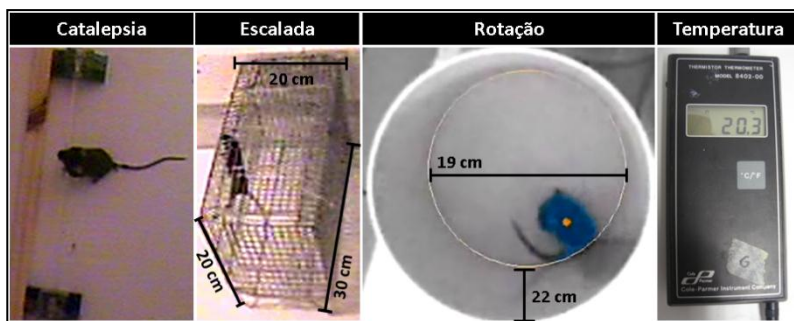


Figura 17. Os aparatos utilizados nos experimentos de desafios farmacológicos. Na tarefa da escalada, o animal está apresentado escore 2 (ver texto acima), e pode-se observar o comportamento de rotação do camundongo no tubo circular de cor branca.

3.5.3. Catalepsia induzida por haloperidol

A postura cataléptica de roedores tem sido amplamente utilizada como ferramenta no estudo de agentes neuroprotetores em modelos experimentais de Parkinsonismo (Weihmuller, Hadjiconstantinou *et al.*, 1990; Hille, Fox *et al.*, 2001; Morelli e Wardas, 2001; Mihara, Mihara *et al.*, 2007). Este paradigma foi utilizado para avaliar o efeito neuroprotetor do exercício físico, após três semanas do tratamento intranasal de MPTP (Figura 11, página 32). A postura de catalepsia foi medida após 30 min do tratamento com haloperidol (0,32 mg/kg, i.p.) (Shiozaki, Ichikawa *et al.*, 1999; Mihara, Mihara *et al.*, 2007). O tempo de manutenção das patas dianteiras e traseiras sobre uma barra horizontal (\varnothing 3 mm, 4,5 cm de altura, 10 cm de largura) foi registrado de modo independente (Figura 17). A postura cataléptica foi avaliada manualmente pelo escore descrito por Shiozaki, Ichikawa *et al.* (1999):

- 0) postura cataléptica < 5 s em ambas as patas dianteiras e traseiras,

- 1) postura cataléptica das patas dianteiras 5-10 s, e das patas traseiras < 5 s, ou vice-versa,
- 2) postura cataléptica das patas dianteiras > 10 s, e das patas traseiras < 5 s,
- 3) postura cataléptica de patas dianteiras e traseiras 5-10 s, ou postura das patas dianteiras < 5 s e das patas traseiras > 10 s,
- 4) postura cataléptica de patas dianteiras > 10 s, e traseiras 5-10 s, ou postura cataléptica de patas dianteiras 5-10 s, e traseiras > 10 s, e,
- 5) postura cataléptica de patas dianteiras e traseiras > 10 s.

3.5.4. Rotações induzidas por R(-)-apomorfina

A denervação pré-sináptica unilateral no estriado causa supersensibilidade de receptores dopaminérgicos pós-sinápticos e 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] (Cooper, Bloom *et al.*, 2003) ([link](#) para vídeo). O comportamento de rotação apresenta duas características fundamentais de acordo com Alexander, Crutcher *et al.* (1990): (i) assimetria, de orientação contralateral [R(-)-apomorfina] ou ipsilateral (D-anfetamina) ao lado lesionado, e (ii) frequência diretamente dependente da intensidade da lesão. Esta ferramenta tem sido utilizada para avaliar os efeitos paliativos do exercício em roedores hemiparkinsonianos (Tabela 7, apêndice I). O desafio com R(-)-apomorfina foi realizado para selecionar os animais hemiparkinsonianos nos experimentos 1 e 3 (Figuras 8 e 13, respectivamente), e para acompanhar a evolução da neurodegeneração no experimento 1, após duas, três e quatro semanas da lesão com 6-OHDA (Figura 8, página 29).

Os camundongos foram colocados em cilindros individuais (Ø 19 cm, 22 cm de altura, Figura 17, página 40) para registro do comportamento rotacional durante a habituação de 10 min, e após a injeção de R(-)-apomorfina (0,6 mg/kg, s.c.) durante 30 min. A distância percorrida (m), e as rotações ipsi/contralaterais (em relação ao lado da cirurgia) foram avaliadas através da plataforma ANY-maze™.

3.5.5. Discinesias induzidas pela L-DOPA

Quatro semanas após a administração intra-estriatal de 6-OHDA, os animais foram tratados durante duas semanas com injeções diárias de L-DOPA (25 mg/kg, i.p.), combinada com benserazida (12,5 mg/kg, i.p.), um inibidor da enzima DOPA-descarboxilase periférica, para a indução de discinesias motoras (Lundblad, Picconi *et al.*, 2004; 2005; Pavon, Martin *et al.*, 2006) e avaliação dos efeitos antidiscinéticos do exercício físico (Figura 13, página 33). As discinesias em roedores são classificadas em quatro subtipos de acordo com sua topografia (Lundblad, Picconi *et al.*, 2004):

- i) discinesia das patas anteriores, distonia ou movimentos hipercinéticos da pata anterior no plano sagital ou frontal (Figura 14, seta amarela, página 36),
- ii) discinesia axial, posturas torcidas do tronco superior e pescoço, orientados contra lateralmente ao lado da cirurgia (Figura 14, seta branca, página 36)
- iii) discinesia orolingual, espasmos da musculatura orofacial, e protrusão da língua orientada contra lateralmente ao lado da cirurgia (Figura 14, seta verde, página 36)
- iv) locomoção, movimento circular com viés ao lado contralateral da cirurgia.

No presente trabalho, as discinesias das patas, axial, orolingual, e locomoção foram avaliadas no último dia de tratamento com L-DOPA (i.e. dia 13) em cilindros individuais (\emptyset 12 cm, 15 cm de altura, Figura 14, página 37) durante 120 min após a injeção de L-DOPA, através de registro manual em intervalos de 20 min (patas, axial, orolingual). De modo simultâneo, os movimentos naturais de auto-limpeza (“grooming”) e levantamentos (“rearings”) foram registrados para controle motor do experimento. As discinesias das patas, axial e orolingual, e os movimentos de auto-limpeza e levantamentos, foram pontuados em uma escala de frequência de 0 a 4 segundo descrição de Lundblad, Picconi *et al.* (2004): 0 = ausente, 1 = ocasionalmente, 2 = frequente, 3 = contínua, mas interrompida por distração sensorial, e 4 = contínua, grave e ininterrupta. O número de rotações e o deslocamento foram avaliados em cilindros individuais (\emptyset 19 cm, 22 cm de altura, Figura 17, página 40) através da plataforma ANY-maze™. A amantadina (40 mg/kg, i.p.) foi usada como controle antidiscinético e administrada 100 min antes da avaliação das discinesias.

3.5.6. Hipotermia induzida pelo MPTP

Existem diversas evidências demonstrando a diminuição da temperatura corporal após o tratamento sistêmico com MPTP em roedores (Eaker, Bixler *et al.*, 1987; Miller e O'Callaghan, 1994; Freyaldenhoven, Ali *et al.*, 1995). O papel desta hipotermia é controverso, mas parece estar envolvido com mecanismos de neuroproteção (Zhao, Richardson *et al.*, 1996; Moy, Albers *et al.*, 1998). Neste trabalho, a temperatura retal de camundongos sedentários e exercitados foi medida 30 min, 1, 2, 4, 6, 12 e 24 h após a administração intranasal de MPTP (experimento 2). Após o tratamento, os animais foram alojados coletivamente em gaiolas, em uma sala com temperatura controlada 23°C e ciclo claro-escuro de 12 h. A temperatura corporal foi mensurada por uma sonda para camundongos (Ø 4,2 mm) introduzida 1-2 cm no reto dos animais, conectada a um termômetro (modelo Thermistor #8402-00, Cole-Parmer, Vernon Hills IL, EUA, Figura 17, página 40) com acurácia de 0,1°C.

3.6. Experimentos bioquímicos

3.6.1. Imunodeteção de proteínas

As neurotoxinas MPTP e 6-OHDA causam neurodegeneração dopaminérgica nos núcleos da base que pode ser mensurada pela detecção dos níveis de TH no estriado e mesencéfalo através de IHQ e *western blotting* (Burns, Chiueh *et al.*, 1983; Langston, Ballard *et al.*, 1983; Gerlach e Riederer, 1996; Schwarting e Huston, 1996).

3.6.1.1. Imuno-histoquímica (IHQ) para tirosina hidroxilase (TH)

Este método foi utilizado para avaliar a hipótese neuroprotetora do exercício físico, após quatro semanas (experimento 1) do tratamento intra-estriatal com 6-OHDA. Os animais foram perfundidos com PBS (0,1 M NaH₂PO₄·H₂O, 0,1 M NaH₂PO₄·12H₂O, 0,1 M NaCl, pH 7,4) seguido de paraformolaldeído 4%; e os cérebros foram crio-protegidos em sacarose 30%, e em seguida o estriado e mesencéfalo foram cortados em seções coronais de 20 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 ordem seguinte, 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% (30 min) para bloqueio das reações inespecíficas, e anticorpo primário anti-TH 1:1.000 (IgG, monoclonal para camundongo,

Diasorin #22941, Sallugia, Itália) (48 h, 4°C), (iv) anticorpo secundário 1:250 (1 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 seções foram lavadas em tampão A (3 x 5 min, temperatura ambiente). As seções foram então (vi) lavadas em tampão TB 0,25 M (tampão Tris 1 M, Ph 7,4) (3 x 5 min, temperatura ambiente), (vii) incubadas em uma solução DAB (3,3'tetrahidrocloro de diaminobenzidina) em tampão TB 0,1 M, e (viii) 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 (24 x 60 mm), e desidratadas em banhos consecutivos (30 s) de etanol 30%, 70%, 95% (2 x) e 100% (2 x) e xilenol 100% (3 x).

As lâminas foram montadas em uma plataforma para quantificação de seções histológicas (Mercator Pro 7.5, Explora Nova, La Rochelle, França) conectadas a um microscópio (Nikon Eclipse E600) para (i) registro fotográfico do estriado (objetiva 2,5 x), (ii) mapear a SN [núcleo A9 (German e Manaye, 1993)] (objetiva 2,5 x), e (iii) contar as células marcadas com TH (objetiva 40 x). A densidade óptica média do TH no estriado (n = 10 seções/animal) foi analisada na plataforma ImageJ (1.44p, National Institute of Health, EUA). Para a SN, foi contado o número de células positivas para TH na região A9 (n = 10 seções/animal), definido pelo número total de somas TH-imunorreativos com ou sem núcleo visível (German, Nelson *et al.*, 1996).

3.6.1.2. Western blotting

Este método foi utilizado para avaliar a hipótese neuroprotetora do exercício físico, após 3 semanas (experimento 2) do tratamento intranasal com MPTP.

Este método foi utilizado para avaliar a hipótese neuroprotetora do exercício físico, após 3 semanas (experimento 2) do tratamento intranasal com MPTP. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e os estriados dissecados, pesados e homogeneizados mecanicamente (1:10 v:v) em tampão Tris-base 50 mM, EDTA 1 mM (ácido etileno-diamino-tetracético), 100 mM NaF, Na₃VO₄ 2 mM (ortovanadato de sódio), Triton X-100 1%, glicerol 10%, pH 7, e coquetel inibidor de proteínas (PMSF, Leupeptina 0,1 mM, Aprotinina, Pepstatina). Os lisados foram centrifugados (13.000 rpm G, 20 min, 4°C) para eliminar restos celulares e os sobrenadantes foram diluídos 2/1 (v/v) em tampão Tris-100 mM, EDTA 4 mM, SDS 8%,

glicerol 20%, β -mercaptoetanol 8%, pH 6,8. As proteínas totais das amostras estriatais foram dosadas pelo método de Lowry modificado (Peterson, 1977). As amostras (40 μ g de proteína total/corrida) foram separadas por SDS-PAGE 10% (1,2 mA/cm², 1,5 h), onde as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Depois, as membranas foram bloqueadas (1 h) com leite desnatado 5% em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,5), e posteriormente incubadas com anticorpos primários (Tabela 6) diluídos em TBS-T contendo BSA 2,5%. Após as incubações com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBS-T (3 x 5 min) e incubadas por 1 h em temperatura ambiente com anticorpos secundários específicos (ligados à peroxidase) com diluição 1:4.000. Para detecção dos complexos imunes, as membranas foram lavadas três vezes (5 min) com TBS-T e duas vezes com TBS, sendo que as bandas correspondentes às respectivas proteínas foram reveladas através de kit ECL (quimiluminescência) conforme as recomendações do fabricante. A densidade óptica das bandas foi quantificada utilizando a plataforma ImageJ (1.44p, National Institute of Health, EUA, baixado de <http://rsbweb.nih.gov/>).

Tabela 6. Anticorpos primários utilizados no presente estudo.

Anticorpo	Empresa #código	Tipo	Origem	D	kDa
Anti-cFos	Merck #PC38	Poli-clonal	Coelho	1:200	~55
Anti-cdk5	Santa Cruz #6247	Mono-clonal	Camun-dongo	1:200	~35
Anti-Receptor D ₂	Santa Cruz #5303	Mono-clonal	Camun-dongo	1:200	48-51
Anti-DARPP-32	Cell Signaling #2302	Poli-clonal	Coelho	1:1.000	~32
Anti-Phospho-DARPP-32 (thr34)	Cell Signaling #2304	Poli-clonal	Coelho	1:1.000	~32
Anti-Phospho-DARPP-32 (thr75)	Cell Signaling #2301	Poli-clonal	Coelho	1:1.000	~32
Anti-TH	Santa Cruz #7847	Poli-clonal	Cabra	1:200	~60

Abreviações: cdk5 – quinase 5 dependente de ciclina. 5. D – diluição. DARPP-32 – fosfoproteína regulada por DA e AMPc de 32 KDa, D₂R – receptor D₂ para DA. TH – tirosina hidroxilase.

Os reagentes acrilamida, bis-acrilamida, β -mercaptoetanol, nitrocelulose Hybond™, dodecil sulfato de sódio (SDS), e Tris são da grade analítica de nosso laboratório. Os anticorpos secundários, ECL (*enhanced chemiluminescence*) e reagentes de detecção foram obtidos a partir da GE Healthcare e Santa Cruz Biotechnology®.

3.6.2. Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que os níveis estriatais de DA e de seus metabólitos não-conjugados, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA) diminuem após a administração intranasal de MPTP em roedores (Prediger, Batista *et al.*, 2006; Prediger, Aguiar *et al.*, 2010). O HPLC foi realizado para avaliar os efeitos neuroprotetores do exercício físico, três semanas após o tratamento intranasal com MPTP (Figura 11, página 32). Foi utilizado o HPLC de fase reversa acoplado a detector eletroquímico (HPLC-ED; Shimadzu Modelo 6A) com uma coluna cromatográfica (150 x 4,6 mm) (Shimpak – ODS C 18), em fase reserva com pareamento iônico, segundo protocolo previamente descrito por Felicio *et al.* (1996), para medir os níveis de DA, DOPAC e HVA no bulbo olfatório e estriado dos animais. Os tecidos cerebrais foram homogeneizados por sonicação durante 2-3 min em uma cuba de gelo seco, com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA), utilizado como padrão para as dosagens de monoaminas. A fase móvel para o HPLC utilizada consistiu em um sistema isocrático formado por tampão citrato 0,02 M, metanol 92/8 (v/v), 0,12 nM EDTA sódico e 0,0556% de ácido 1-heptanosulfônico (HSA), pH 3. A fase móvel foi filtrada em um sistema a vácuo, desareada por 15 min em um degaseificador a hélio antes de ser instalada no HPLC, que circulou em fluxo 1 ml/min durante 12 h (*overnight*) para equilíbrio da coluna. O detector foi mantido com um potencial de 0,8 V no eletrodo de trabalho. Para referência, foram utilizadas concentrações padrão de 1 nM de DA, DOPAC e HVA diluídos em ácido clorídrico 0,1 M contendo 0,02% de Na₂S₂O₅. No momento da análise, os padrões foram diluídos 2.500 a 10.000 vezes em ácido perclórico 0,1 M. Ao menos dois padrões foram injetados no HPLC-ED diariamente, antes e ao final das dosagens dos homogenatos. A primitiva da curva dos padrões foi usada para quantificar as amostras. Os valores obtidos foram expressos em ng/g de tecido úmido (Felicio *et al.*, 1996).

3.6.3. Atividades enzimáticas

3.6.3.1. Citrato sintase (CS, EC 2.3.3.1)

O aumento da respiração e número de mitocôndrias no músculo esquelético de animais após o treinamento físico é algo bem estabelecido na literatura (Arcos, Sohal *et al.*, 1968; Kraus, Kirsten *et al.*, 1969; Barnard, Edgerton *et al.*, 1970) e padronizado em nosso laboratório (Aguiar, Speck *et al.*, 2008; Aguiar, Boemer *et al.*, 2010; Aguiar e Prediger, 2010). Esta respiração mitocondrial pode ser expressa pela atividade da citrato sintase (CS), a enzima marca-passo do ciclo de Krebs (tricarboxílico ou do ácido cítrico) da matriz mitocondrial (Kuznetsov, Strobl *et al.*, 2002; Renner, Amberger *et al.*, 2003). Para o controle do exercício físico, os músculos *quadriceps femoris* de ambas as patas traseiras dos animais sedentários e exercitados foram removidos 48 h após a última sessão de exercício de cada experimento (Figuras 8, 11 e 13), para análise das atividades da enzima citrato sintase e NADH (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) desidrogenase (ou complexo I) em mitocôndrias isoladas deste tecido.

Os tecidos muscular e cerebral foram dissecados e rapidamente processados a fresco (sem passar por congelamento) para o isolamento das mitocôndrias (Latini, Rodriguez *et al.*, 2005; Aguiar, Boemer *et al.*, 2010). As amostras (*pool* de 3 animais) foram homogeneizadas 1:20 em tampão fosfato 50 mM (0,3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, EGTA 1 mM, albumina de soro bovino 0,1%, pH 7,4), e posteriormente centrifugadas (3.000 G, 10 min, 4°C). O sobrenadante passou por nova centrifugação (15.000 G, 10 min, 4°C), e a fração mitocondrial foi resuspendida em 700 µl do tampão fosfato 50 mM (Latini, Rodriguez *et al.*, 2005). Neste momento, o conteúdo proteico da fração mitocondrial diluída 1:10 foi determinado pelo método de Lowry (1951) usando albumina bovina como padrão. Deste modo, foram obtidas amostras de mitocôndrias isoladas de tecido nervoso e musculoesquelético.

Para mensuração da atividade da CS, as mitocôndrias musculares (5 mg/ml) foram pré-incubadas (10 min, 30°C) em tampão respiração (DTNB 0,1 mM, Triton X-100 0,25%, oxalacetato 0,5 mM, e Acetil CoA 0,31mM). A atividade da CS foi obtida pelo coeficiente de extinção do DTNB em 420 nm (30°C, pH 8,1, $\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). As atividades dos complexos do sistema respiratório foram calculadas como nmol/min/mg de proteína.

3.6.3.2. NADH desidrogenase (Complexo I, EC 1.6.5.3)

O conjunto telencéfalo/diencéfalo foi dissecado para avaliação (i) dos efeitos do exercício físico na função mitocondrial do SNC, e da (ii) atividade do complexo I mitocondrial frente a inibidores, no caso o MPP⁺ e a rotenona (experimento 2). Para análise da inibição da atividade do complexo I mitocondrial, as mitocôndrias cerebrais (2 mg/ml proteína) foram incubadas durante 0, 10, 30, 60 e 90 min com rotenona (5 µM) ou MPP⁺ (0,02; 0,5 e 2,5 mM) em tampão respiração (DTNB 0,1 mM, Triton X-100 0,25%). A atividade do complexo I mitocondrial (NADH desidrogenase) foi obtida pelo coeficiente de redução do ferricianeto dependente de NADH em 420 nm (30°C, $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (Cassina e Radi, 1996). As atividades dos complexos do sistema respiratório foram calculadas como nmol/min/mg de proteína.

3.6.3.4. Glutathiona total (GSH-t), GSH redutase (GR, EC 1.8.1.7) e GSH peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9)

O sistema antioxidante dependente de GSH foi investigado uma vez que respostas de hipotermia têm sido associadas a menores danos oxidativos, principalmente em situações de isquemia-reperfusão (Gunn, Battin *et al.*, 2005; Gunn e Thoresen, 2006; Ji, Luo *et al.*, 2007). O pico de hipotermia nos animais tratados com MPTP (Figura 26) ocorreu após 6 h do tratamento, quando o estriado dos animais foi removido para avaliação do conteúdo de GSH e da atividade das enzimas GR e GPx. O estriado foi isolado, pesado e homogeneizado em ácido perclórico 0,5 M e centrifugado (15.000 G, 2 min, 4°C). O sobrenadante foi separado e diluído 1:10 em tampão fosfato (0,1 M KPI, pH 7,4) para avaliar o conteúdo GSH-t. Para medida das atividades enzimáticas, o estriado foi homogeneizado em tampão HEPES 20 mM (pH 7,4, 4°C), centrifugado (20.000 G, 30 min, 4°C), e armazenado a -70°C.

Para a medida do GSH-t, foi utilizado o método cíclico-enzimático descrito originalmente por Tietze (1969) e adaptado por Akerboom e Sies (1981), que detecta tanto a forma oxidada (GSSG) quanto à forma reduzida (GSH) da GSH, definido como glutathiona total (GSH-t). O reagente de Ellman, ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB), reage espontaneamente com GSH formando o ânion colorido TNB e o conjugado incolor GS-TNB (Ellman, 1959). A GR cliva este conjugado e utiliza NADPH como cofator, resultando em GSH e TNB, desenvolvendo mais cor. A GSH reage novamente com DTNB reiniciando o ciclo. Caso haja presença de GSSG, esta é primeiramente reduzida a GSH pela ação da

enzima glutationa redutase (GR). As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 412 nm durante 1-4 min em tampão fosfato de potássio 0,1 M (1 mM EDTA, 0,1 mM DTNB, 0,2 mM NADPH). Após a adição da amostra ou do padrão, a reação foi iniciada pela adição da GR 0,2 U/ml. A concentração de GSH-t foi obtida pela comparação das absorbâncias das amostras com a absorbância de uma curva padrão de GSSG (0,1-1 nmol/ml). A reação basal (branco), sem a presença de GSSG ou amostra, foi descontada da absorbância/min obtido na presença do padrão ou da amostra. O valor obtido foi multiplicado pelas diluições.

A GR catalisa a redução da GSSG, através da oxidação do NADPH, que pode ser acompanhada espectrofotometricamente em 340 nm ($\epsilon = 6,220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em tampão fosfato 0,1 M (1 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, pH 7). A velocidade de consumo de NADPH, em condições de saturação, expressa sua atividade enzimática (Carlberg e Mannervik, 1985). O consumo inespecífico de NADPH foi mensurado por 2-4 min a 340 nm após adição da amostra, que foi descontado da leitura por mais 2-4 min na presença do substrato GSSG 1 mM. O valor obtido foi dividido pelo coeficiente de extinção molar do NADPH ($\epsilon = 6,22 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) e multiplicado pelas diluições.

A GPx catalisa a redução de H_2O_2 , bem como de outros lipoperóxidos, utilizando GSH como co-substrato para esta reação e produzindo glutationa oxidada GSSG, que é reduzida a GSH pela GR com consumo de NADPH, como visto no parágrafo anterior. A medição da atividade da GPx foi realizada nas mesmas condições que a GR, entretanto a amostra foi diluída em tampão fosfato 0,1 M (1 mM EDTA, 0,2 mM NADPH, pH 7) com a presença de GSH 1 mM.

Os valores foram expressos como mUnidades/mg de proteína. Uma Unidade corresponde a 1 mmol/min. O conteúdo proteico foi analisado pelo método de Lowry (1951).

3.6.4. Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA)

A inibição da atividade do complexo I mitocondrial pelo MPP^+ causa um desvio na redução do oxigênio para a formação de ânions superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Figura 6, página 22), o precursor da maior parte das espécies reativas de oxigênio (EROs), que é rapidamente dismutado em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) [revisado em Aguiar e Pinho (2010)]. Esta produção de ROS pode ser acompanhada pela fluorescência do DCFH-DA, que detecta indiretamente a quantidade de H_2O_2 intracelular (Cathcart, Schwiers *et al.*, 1983). A conversão do DCFH-DA não-fluorescente ao altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) ocorre em várias

etapas. Primeiro, o DCFH-DA cruza a membrana celular sendo deacetilado no 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) não-fluorescente. O DCF fica aprisionado dentro da célula, sendo convertido no fluorescente DCF na presença de peróxidos (Lebel, Ischiropoulos *et al.*, 1992).

Para avaliar o efeito do exercício nos níveis de estresse oxidativo e hipotermia induzido pelo MPTP intranasal (experimento 2) (Freyaldenhoven, Ali *et al.*, 1995; Moy, Albers *et al.*, 1998), foi mensurada a produção de EROs pelo método de LeBel (1992). O estriado foi isolado, pesado e homogeneizado em ácido perclórico 0,5 M após 6 h do tratamento intranasal com MPTP (mesmo tempo de análise da GSH, GR e GPx), depois foi centrifugado (15.000 G, 2 min, 4°C) e o sobrenadante foi separado e diluído 1:10 em tampão fosfato (0,1 M KPI, pH 7,4). O DCFH-DA foi incubado 1:1 nas alíquotas de estriado durante 30 min a 37°C, e a fluorescência foi medida em 480 nm (excitação) e 535 nm (emissão). A curva de calibração foi construída com DCF padrão (0-10 µM) e a concentração das espécies reativas foram expressos como pmol de DCF formado/mg de proteína. O conteúdo proteico foi analisado pelo método de Lowry (1951).

3.6.5. Radioisótopos

3.6.5.1. Captação de DA em sinaptossomas

Os sinaptossomas são terminais nervosos, sendo seu conteúdo vesicular e citoplasmático, e parte de suas conexões pós-sinápticas separadas por fracionamento e centrifugação seletiva (Bai e Witzmann, 2007), utilizados no estudo da transmissão sináptica, pois são capazes de captar, armazenar e liberar neurotransmissores (Dunkley, Jarvie *et al.*, 2008). Um estriado (± 15 mg) foi homogeneizado em 750 µl de sacarose 0,32 M (4°C) e centrifugado (1.000 G, 10 min, 4°C). O sobrenadante passou por nova centrifugação (30.000 G, 10 min, 4°C) para obter uma fração de sinaptossomas resuspendidos em 360 µl de sacarose 0,32 M (4°C). Os sinaptossomas foram diluídos 1:1 em 50 µl do tampão A (4 mM Tris, 6,25 mM HEPES, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂ 2H₂O, 1,2 mM MgSO₄ 7H₂O, 5,6 mM glicose, 1 mM ácido ascórbico). Esta alíquota de 100 µl foi aquecida a 37°C durante 7 min, somado a (i) 50 µl de maleato de nomifensina 12 µM, ou controle (tampão A), e (ii) 50 µl de [³H]-DA 40 nM (1 mCi/ml). Em seguida, as amostras foram rapidamente filtradas a 4°C (filtros Whatman[®] GF/B pré-incubados com poli-etilenoimina 0,05% durante 20-30 min), e lavadas 3-5 vezes em tampão A a 4°C. Após estabilização, a quantidade de [³H] captada nos filtros foi lida em

meio líquido de cintilação durante 7 min. A captação [^3H]-DA foi calculada como a diferença entre a quantidade total de [^3H]-DA captada pelos filtros e o componente inespecífico de captação na presença de nomifensina, um inibidor da recaptação de DA. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

3.6.5.2. Liberação glutamato em fatias de estriado

Como descrito anteriormente, alterações na neurotransmissão glutamatérgica córtico-estriatal têm sido implicadas no desenvolvimento das discinesias induzidas pelo tratamento crônico com L-DOPA em roedores (Robelet, Melon *et al.*, 2004; Santini, Valjent *et al.*, 2007) e primatas (Papa e Chase, 1996; Blanchet, Konitsiotis *et al.*, 1998). A eficácia de antagonistas glutamatérgicos, como o MK-801 e a amantadina, no alívio destas discinesias fortalece esta hipótese (Papa e Chase, 1996; Blanchet, Konitsiotis *et al.*, 1998), embora os efeitos adversos que acompanham o uso da amantadina (ex: confusão mental e alucinações) representem fatores limitantes do seu uso clínico (Parkes, 1981). Nesta tese, foi investigado o papel do exercício físico na liberação de glutamato (Glu) no estriado de camundongos hemiparkinsonianos discinéticos tratados com L-DOPA durante duas semanas (Figura 13, página 33).

Os estriados foram dissecados e processados em fatias de modo fresco, sem passar pelo congelamento, num procedimento modificado de Oliveira (2002). Os estriados foram incubados em tampão resfriado (4°C) Krebs-Ringer bicarbonato [(KRB) 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,3 mM CaCl₂, 0,4 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ e 10 mM D-glucose] gaseificado com carbogênio (O₂ 95%, CO₂ 5%) em pH 7,4. As fatias foram cortadas a 0,4 mm (McIlwain™ Tissue Chopper) em tampão KRB a 4°C. Depois, as fatias foram incubadas durante 30 min em tampão KRB a 37°C, depois em solução salina balanceada de Hank [(HBSS) 1,29 mM CaCl₂, 136,9 mM NaCl, 5,36 mM KCl, 0,65 mM MgSO₄, 0,27 mM Na₂HPO₄, 1,1 mM KH₂PO₄, e 5 mM HEPES], e finalmente foi adicionado Glu (10 mM) por 15 min. A captação [^3H]-Glu foi avaliada pela adição de 0,33μCi/ml L-[^3H]-Glu com 100 mM de Glu não-marcado durante 7 min. As fatias foram lavadas (3 x 1 ml HBSS), incubadas em HBSS durante 15 min, e o sobrenadante foi coletado para mensuração da quantidade de L-[^3H]-Glu liberada no meio durante incubação (*overnight*). Depois, as membranas das fatias foram permeabilizadas com NaOH 0,1% e SDS 0,01% para determinação dos níveis intracelulares de L-[^3H]-Glu (Tavares, Tasca *et al.*, 2002). Os níveis intracelulares e extracelulares de L-[^3H]-Glu foram lidos em meio líquido de cintilação. A liberação do

glutamato foi calculada como porcentagem do glutamato total. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry (1951).

3.7. Análise estatística

A plataforma utilizada para a análise estatística foi o programa STATISTICA versão 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, EUA). De modo geral, os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). A exceção foi o número de quedas no teste basal do rota-rod (Figura 20A, página 60) e a severidade da catalepsia (Figura 30C, página 72) que foram expressos como mediana \pm intervalo interquartil. A distribuição das posturas catalépticas (Figura 30B, página 72) foi expressa em % de animais do grupo. A comparação entre as médias foi realizada com o teste t de *Student*, e a interação entre os fatores em estudo (exercício e tratamento) foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, ou para medidas repetidas quando necessário. Nestes casos, o teste *post-hoc* foi o de Newman-Keuls (duas vias) e Bonferroni (repetição). A comparação das medianas foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pela análise *post-hoc* de Dunns. A variação conjunta da temperatura e dos níveis de H₂O₂ e GSH foram analisados pelo teste de covariância (ANCOVA). A comparação da distribuição amostral foi realizada pelo teste do chi-quadrado (χ^2). O nível de significância aceito foi de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. O exercício de corrida aumenta a atividade muscular mitocondrial em camundongos

A Figura 18A ilustra a progressão do programa de corrida em esteira ergométrica – velocidade e distância – implementada aos camundongos nos experimentos 1 e 2. A análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas demonstrou que os valores agudos do lactato sanguíneo aumentaram significativamente em relação aos níveis de repouso ($F_{6,48}=46,3$, $P<0,05$, Figura 18A). Além disso, a intensidade da corrida manteve-se na faixa moderada durante todo o programa de treinamento (Figura 18A). Ao final das seis semanas de exercício, as atividades das enzimas citrato sintase e NADH desidrogenase (ou complexo I) das mitocôndrias do músculo dos animais exercitados foi significativamente maior em comparação ao grupo sedentário (citrato sintase $t_{0,05;10}=3,37$; NADH desidrogenase $t_{0,05;10}=3,17$; $P<0,05$; Figura 18B). Isto sugere que o programa de corrida utilizado aumentou a atividade glicolítica e oxidativa muscular dos camundongos, corroborando descrições prévias da literatura (Navarro, Gomez *et al.*, 2004; Al-Jarrah, Pothakos *et al.*, 2007; Aguiar, Boemer *et al.*, 2010).

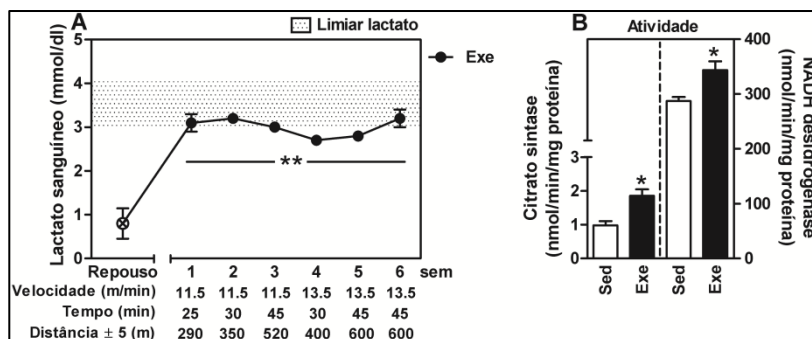


Figura 18. O protocolo de exercício e as modificações atléticas induzidas pela corrida em esteira nos camundongos. Os níveis séricos de lactato sanguíneo (A) mantiveram-se dentro da faixa de intensidade moderada durante a corrida, e atividade muscular mitocondrial (B) aumentou após 6 semanas. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. ** $P<0,05$ vs. Repouso (ANOVA com medidas repetidas seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni). * $P<0,5$ vs. Sed (teste t de Student). Exe – Exercício; NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo; Sed – Sedentário.

Já no experimento 3, utilizando o exercício voluntário em rodas de correr, os camundongos correram no primeiro dia

aproximadamente 270 m a uma velocidade média de 8,4 m/min. Ao final de 2 semanas de livre acesso às rodas de correr, a ANOVA com medidas repetidas e a análise *post-hoc* de Bonferroni revelaram que a distância diária de corrida quadruplicou ($F_{13,104}=108,0$, $P<0,05$, Figura 19A), enquanto a velocidade média duplicou ($F_{13,104}=87,1$, $P<0,05$, Figura 19B), e a máxima triplicou ($F_{13,104}=99,2$, $P<0,05$, Figura 19B) os valores iniciais de exercício. Esta utilização progressiva das rodas de correr pelos camundongos está de acordo com relatos prévios da literatura (Van Praag, Kempermann *et al.*, 1999; Allen, Harrison *et al.*, 2001). Estas duas semanas de exercício também aumentaram significativamente a razão entre as atividades das enzimas NADH desidrogenase (ou complexo I) e citrato sintase no grupo exercício em relação ao grupo controle sedentário ($t_{0,05;16}=2,3$, $P<0,05$, Figura 19C). Isto sugere que os protocolos de exercício utilizados, tanto nas rodas de correr quanto na esteira ergométrica, aumentaram a biogênese mitocondrial muscular dos camundongos, corroborando relatos prévios da literatura (Waters, Rotevatn *et al.*, 2004; Ikeda, Kawamoto *et al.*, 2006).

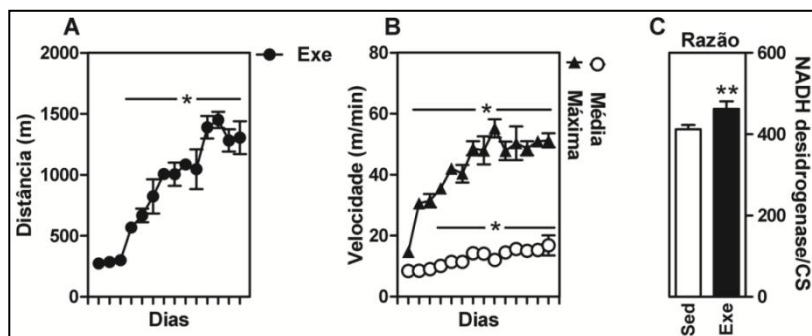


Figura 19. As distâncias e velocidades de corridas diárias realizadas pelos camundongos hemiparkinsonianos tratados com L-DOPA nas rodas de correr voluntárias. A distância de corrida (A), e as velocidades médias e máximas (B) aumentaram exponencialmente desde o primeiro dia de treinamento. O exercício possivelmente aumentou o número de mitocôndrias nos músculos dos camundongos, indicado pelo aumento da razão entre a NADH desidrogenase (ou complexo I) e a citrato sintase no grupo exercício (C). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P<0,05$ vs. Dia 1 (ANOVA com medidas repetidas seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni) ** $P<0,5$ vs. Sed (teste t de *Student*). CS – citrato sintase; Exe – exercício; NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo; Sed – sedentário.

4.2. O exercício previne os prejuízos motores induzidos pela administração intra-estriatal de 6-OHDA em camundongos

A Figura 20 mostra os efeitos do exercício físico e da administração intra-estriatal de 6-OHDA no desempenho dos animais nas tarefas do rota-rod e do cilindro. Após uma semana da lesão com 6-OHDA, o teste de Kruskal-Wallis indicou a ausência de diferenças significativas entre os grupos no desempenho basal ao rota-rod, tanto no cilindro estático ($H_{3,40}=1,8$, $P=0,6$, Figura 20A) quanto na rotação fixa de 5 RPM ($H_{3,37}=2,1$, $P=0,52$, Figura 20A). Na terceira e quarta semanas após a cirurgia, a ANOVA com medidas repetidas indicou que todos os grupos apresentaram latências significativamente maiores de queda ($F_{3,96}=47,1$, $P<0,05$, Figura 20B), devido ao aumento das velocidades de rotação correspondentes ao momento da queda. Entretanto, os animais sedentários lesionados com 6-OHDA apresentaram um prejuízo no desempenho no teste do rota-rod, observado pela redução nas latências gerais de quedas ($F_{1,32}=11,2$, $P<0,05$, Figura 20C). O exercício também apresentou efeito *per se*, mas na direção oposta à lesão com 6-OHDA, revelado pelo aumento da coordenação motora através de maiores latências de queda ($F_{1,32}=11,9$, $P<0,05$, Figura 20C).

Em relação à tarefa do cilindro, a ANOVA com medidas repetidas e a comparação *post-hoc* de Bonferroni demonstrou que os animais exercitados evoluíram de um modo estatisticamente mais brando para um quadro de assimetria funcional nas patas dianteiras após a lesão com 6-OHDA (sedentários 60-80% e exercício 20-30%, $F_{2,16}=11,9$, $P<0,05$, Figura 20D). De modo semelhante ao observado no teste do rota-rod, os resultados obtidos na tarefa do cilindro indicam que o exercício protege parcialmente os camundongos contra prejuízos motores induzidos pela administração intra-estriatal de 6-OHDA.

4.3. O exercício atenua as rotações induzidas por R(-)-apomorfina em camundongos tratados com 6-OHDA pela via intra-estriatal

No teste das rotações induzidas por R(-)-apomorfina, a ANOVA para medidas repetidas indicou uma clara assimetria após a lesão com 6-OHDA no número e direção das rotações dos animais ($F_{1,62}=217,6$, $P<0,05$, Figura 21A), algo que está bem caracterizado na literatura (Schwartzing e Huston, 1996; Bensadoun, Deglon *et al.*, 2000). Entretanto, enquanto a análise *post-hoc* de Bonferroni demonstrou uma clara evolução do comportamento rotacional [desafiados com R(-)-apomorfina] nos

animais sedentários, o que não ocorreu nos animais exercitados lesionados com 6-OHDA ($F_{2,124}=3,5$, $P<0,05$, Figura 21A).

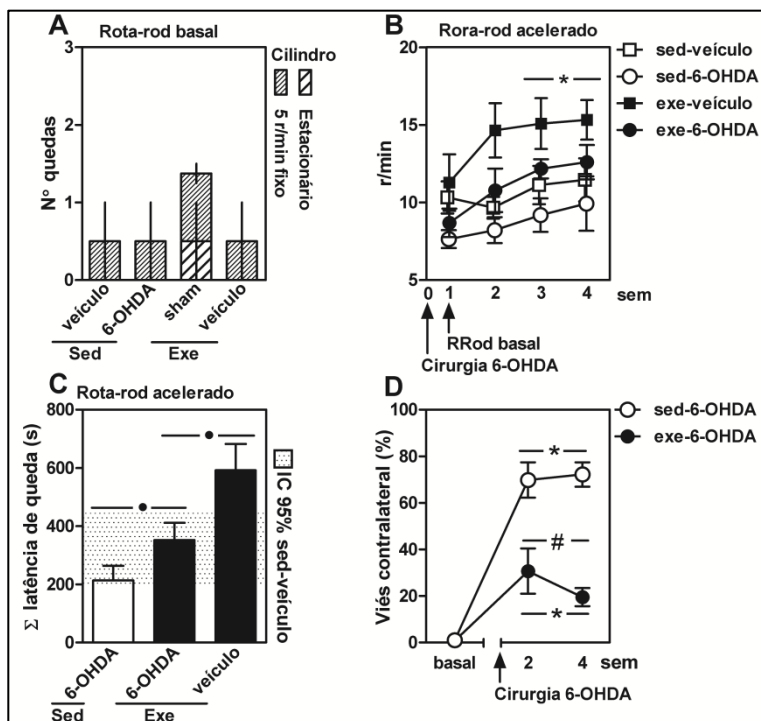


Figura 20. Os efeitos do exercício e do tratamento intra-estriatal com 6-OHDA no desempenho motor de camundongos avaliados nos testes do rota-rod e do cilindro. Os animais sedentários apresentaram um marcado prejuízo motor em ambas às tarefas após a administração intra-estriatal de 6-OHDA. Os animais lesionados com 6-OHDA previamente exercitados apresentaram menores prejuízos nas tarefas do rota-rod (B-C) e do cilindro (D) do que seus controles sedentários. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P<0,05$ vs. Dia 1 ou basal. # $P<0,5$ vs. Sed-6-OHDA (medidas repetidas de ANOVA, teste *post-hoc* de Bonferroni). • $P<0,05$ vs. tratamento 6-OHDA ou exercício. (ANOVA com medidas repetidas seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni). Exe – exercício; Sed – sedentário.

Além disso, o número de rotações foi estatisticamente menor nos animais exercitados após três e quatro semanas da lesão com 6-OHDA (Figura 21A). A Figura 21B apresenta com detalhes a resposta farmacocinética dos animais ao desafio com a R(-)-apomorfina após 4 semanas da lesão com 6-OHDA ($F_{7,210}=2,07$, $P<0,05$, Figura 21B). O teste *post-hoc* de Bonferroni revelou que o número de rotações anti-horárias foi significativamente maior nos animais sedentários tratados com 6-OHDA

após 5 min do desafio com R(-)-apomorfina quando comparado à habituação ou ao seu controle cirúrgico (Figura 21B). Esta resposta ocorreu somente após 10 min da administração de R(-)-apomorfina nos animais exercitados (Figura 21B). Além disso, o comportamento dos animais exercitados foi estatisticamente menor nos primeiros 10 min do desafio com a R(-)-apomorfina em relação ao seu controle sedentário tratado com 6-OHDA.

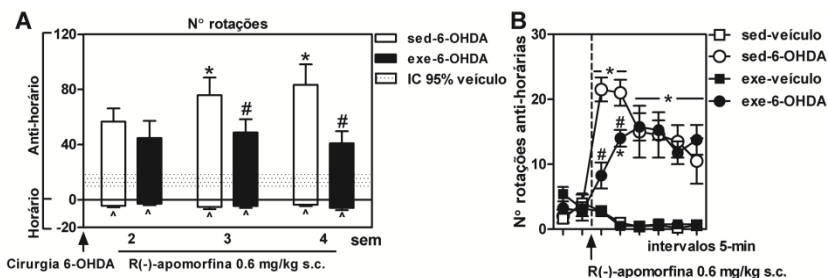


Figura 21. Os efeitos do exercício sobre as rotações induzidas por R(-)-apomorfina em camundongos hemiparkinsonianos. O número de rotações em camundongos hemiparkinsonianos induzido pela R(-)-apomorfina aumentou significativamente ao longo do tempo nos animais sedentários, mas não nos exercitados (A). Na linha do tempo, os animais exercitados apresentam menor sensibilidade à R(-)-apomorfina do que os sedentários (B). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. primeira avaliação; # $P < 0,5$ vs. Sed-6-OHDA; e ^ $P < 0,05$ vs. rotação horária (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni). Exe – exercício; IC – intervalo de confiança; Sed – sedentário; 6-OHDA – 6-hidroxidopamina.

4.4. O exercício previne a degeneração da via dopaminérgica nigro-estriatal induzida pela administração intra-estriatal de 6-OHDA

A Figura 22A-H ilustra os resultados da análise imunohistoquímica. Após 4 semanas da cirurgia estereotáxica, a 6-OHDA diminuiu estatisticamente a densidade óptica para marcação da enzima TH no estriado direito (lesionado) em relação ao lado contralateral, nos animais sedentários ($t_{0,05;10}=9,7$, $P < 0,05$, Figura 22A) e exercitados ($t_{0,05;10}=2,01$, $P < 0,05$, Figura 22A). A ANOVA revelou um efeito significativo para a interação entre os fatores em estudo (exercício vs. tratamento $F_{1,44}=30,2$, $P < 0,05$, Figura 22A), e a análise *post-hoc* de Newman-Keuls confirmou a existência de danos causados pela administração de 6-OHDA em relação aos animais que receberam o veiculo (Figuras 22B-D). Entretanto, este dano foi significativamente menor nos animais exercitados que nos sedentários.

Em relação ao número de células marcadas positivamente para a enzima TH na *SNpc* dos animais, o perfil de lesão foi semelhante ao observado no estriado. O tratamento 6-OHDA diminuiu o número de células TH+ nos animais sedentários (vs. contralateral $t_{0,05;13}=7,4$, $P<0,05$, Figura 22E) e exercitados (vs. contralateral $t_{0,05;13}=10,7$, $P<0,05$, Figura 22E). A ANOVA revelou um efeito significativo da interação entre o exercício e o tratamento com 6-OHDA ($F_{1,26}=3,7$, $P<0,05$, Figura 22E), e a análise *post-hoc* de Newman-Keuls confirmou os danos em relação aos animais que receberam veículo (Figuras F-H). Entretanto, o dano causado pela 6-OHDA foi significativamente menor nos animais exercitados do que nos animais sedentários.

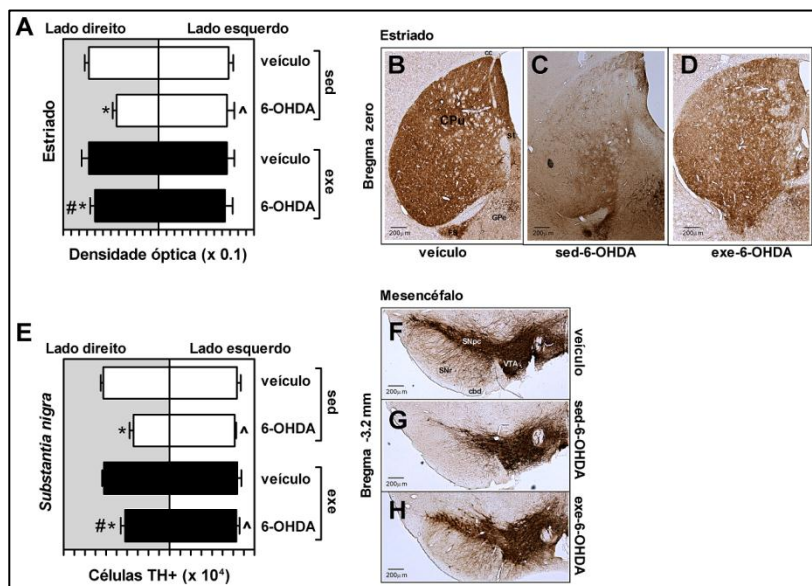


Figura 22. Os efeitos do exercício sobre a neurodegeneração nigro-estriatal induzida pela administração intra-estriatal de 6-OHDA em camundongos. O exercício protege contra os danos induzidos pela 6-OHDA no estriado, indicado por uma maior marcação para TH (A), e apresenta uma tendência neuroprotetora em relação à *substantia nigra* (E). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P<0,05$ vs. sed-veículo e # $P<0,5$ vs. Sed-6-OHDA (ANOVA seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls). ^ $P<0,05$ vs. contralateral (teste t de Student). Exe – exercício; IC – intervalo de confiança; Sed – sedentário; 6-OHDA – 6-hidroxidopamina. TH – tirosina hidroxilase.

Deste modo, os resultados apresentados nas últimas duas seções sugerem que o exercício físico é capaz de desacelerar a evolução do Parkinsonismo induzido pela 6-OHDA [Figura 20 (página 59) e 21],

indicado pela atenuação dos prejuízos motores (Figura 20, página 56), e menor degeneração dopaminérgica da via nigro-estriatal (Figura 22).

4.5. O exercício não previne as alterações olfatórias induzidas pela administração intranasal de MPTP

Os animais tratados com veículo, sedentários (*vs.* 50% $t_{0,05;10}=4,3$, $P<0,05$) e exercitados (*vs.* 50% $t_{0,05;9}=7,5$, $P<0,05$, Figura 23A), foram capazes de discriminar entre os dois ambientes no teste de discriminação olfatória, apresentando preferência pelo ambiente familiar (Figura 23A). Entretanto, a ANOVA revelou que o fator tratamento apresentou efeito significativo para a discriminação olfatória ($F_{1,37}=9,9$, $P<0,05$, Figura 23A), sendo que os animais tratados com MPTP pela via intranasal (independente do fator exercício) não foram capazes de discriminar os dois ambientes. A Figura 23B ilustra o padrão de ocupação dos grupos no teste de discriminação olfatória, e mostra claramente a maior permanência dos animais tratados com veículo no ambiente familiar, enquanto os animais tratados com MPTP ocuparam os dois ambientes sem preferência.

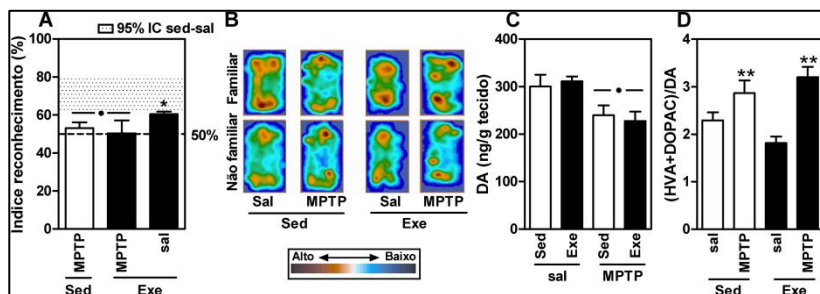


Figura 23. Os efeitos do exercício sobre o prejuízo olfatório e danos no bulbo olfatório induzidos pela administração intranasal de MPTP em camundongos. Os animais tratados com a solução controle foram aptos em discriminar os dois ambientes, indicado pelo maior índice de reconhecimento (A) e pela maior taxa de ocupação do ambiente familiar (B). Entretanto, o tratamento intranasal com MPTP prejudicou esta função, e os animais exploraram de maneira semelhante os dois ambientes (A, B). Três semanas após o tratamento com MPTP, os níveis de DA no bulbo olfatório são menores nos animais tratados (C), assim como o turnover dopaminérgico está elevado (D). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P<0,05$ *vs.* 50% (teste *t* de Student). • $P<0,5$ para fator tratamento e ** $P<0,05$ *vs.* sed-sal (ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). DA – dopamina; DOPAC – ácido diidrofenoilacético; Exe – exercício; HVA – ácido homovanílico; IC – intervalo de confiança; Sed – sedentário.

Além disso, a ANOVA revelou uma diminuição significativa nos níveis de DA ($F_{1,30}=12,1$, $P<0,05$, Figura 23C), e um aumento

significativo do *turnover* dopaminérgico ($F_{1,29}=4,1$, $P<0,05$, Figura 23D) no bulbo olfatório de camundongos após o tratamento intranasal com MPTP. Estes efeitos do MPTP já haviam sido descritos anteriormente (Prediger, Aguiar *et al.*, 2010), e o protocolo de exercício utilizado não foi eficaz em alterar os prejuízos olfatórios induzidos pelo tratamento MPTP utilizado.

4.6. O exercício previne os prejuízos nas memórias implícitas induzidos pela administração intranasal de MPTP

Nas tarefas de aprendizagem e memória, a ANOVA para medidas repetidas demonstrou que todos os grupos foram capazes de aprender à versão operacional do labirinto aquático de Morris, uma vez que o teste *post-hoc* de Bonferroni demonstrou diminuição nas latências para achar a plataforma submersa ao longo das sessões de treinamento ($F_{3,96}=15,6$, $P<0,05$, Figura 24A). Entretanto, a Figura 24B mostra que o desempenho geral nesta tarefa foi significativamente prejudicado pelo MPTP ($F_{1,32}=12,9$, $P<0,05$) e melhorado pelo exercício ($F_{1,32}=4,1$, $P\leq 0,05$). Os controles visual ($F_{1,29}=0,55$, $P=0,46$, Figura 24A direito) e motor (plataforma submersa $F_{1,20}=0,8$, $P=0,36$; plataforma visível $F_{1,26}=0,8$, $P=0,37$, Figura 24C) desta tarefa não foram alterados por nenhum dos fatores (exercício e tratamento) em estudo. A Figura 24D ilustra o padrão de ocupação dos diferentes grupos durante o desempenho da tarefa do labirinto aquático, sendo possível observar a maior eficiência de nado dos animais tratados com salina (sedentários e exercitados), enquanto os animais tratados com MPTP apresentam alto padrão de tigmotaxia (i.e., nado na periferia próximo as bordas do tanque), sendo esta menor nos animais exercitados.

No condicionamento das respostas de medo pareadas ao som ou ao contexto, a ANOVA para medidas repetidas demonstrou que todos os grupos foram capazes de aprender satisfatoriamente estas duas tarefas, sem nenhuma diferença estatística entre os fatores em estudo: exercício *vs.* MPTP [(som $F_{4,68}=179$, $P<0,05$, Figura 25A esquerda) e (contexto $F_{2,54}=6,7$, $P<0,05$, Figura 25A esquerda)]. No teste de evocação realizado após 24 h, as respostas de congelamento não diferiram entre os grupos quando os choques foram pareados ao contexto [(exercício: $F_{1,27}=0,0$, $P=0,96$); (tratamento: $F_{1,27}=0,1$, $P=0,66$); (interação: $F_{4,27}=0,0$ $P=0,99$) (Figura 25B)], mas foram estatisticamente diferentes quando os choques foram pareados ao som [(tratamento: $F_{1,31}=107$, $P<0,05$); (exercício: $F_{1,31}=4,9$, $P<0,05$); (interação: $F_{4,34}=2,8$, $P<0,05$)] (Figura 25A). Em conjunto, estes resultados sugerem que o exercício atenua os prejuízos cognitivos induzidos pela administração intranasal de MPTP.

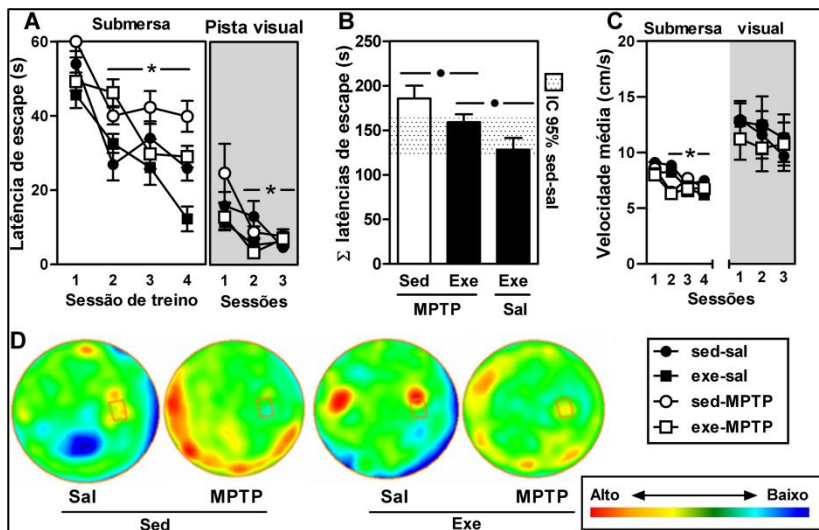


Figura 24. Os efeitos do exercício sobre os prejuízos na memória operacional de camundongos induzidos pela administração intranasal de MPTP avaliados no labirinto aquático. Os animais de todos os grupos apresentaram um bom aprendizado no labirinto aquático (A esquerda), sem apresentar nenhum viés visual (A direita) ou motor (C). Na análise do desempenho geral (B), observou-se que o tratamento intranasal com MPTP prejudicou, enquanto que o exercício melhorou, o desempenho dos animais neste paradigma comportamental. O gráfico de ocupação (D) corrobora os resultados do labirinto aquático, através do padrão espacial de nado dos animais. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. Primeira avaliação, ** $P < 0,05$ vs. sal, e # $P < 0,05$ vs. sed-MPTP (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni). • $P < 0,5$ vs. MPTP ou Exe (ANOVA, teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Exe – exercício; IC – intervalo de confiança; Sed – sedentário.

4.7. O exercício atenua a disfunção mitocondrial induzida pelo MPP⁺, mas não protege contra a neurodegeneração dopaminérgica induzida pela administração intranasal de MPTP

Corroborando resultados prévios do nosso grupo (Prediger, Aguiar *et al.*, 2010), o tratamento intranasal com MPTP (65 mg/kg) diminuiu a densidade da marcação para TH no estriado, assim como o número de neurônios positivos para TH na *SNpc* (Figura 26A). Para avaliar os efeitos do exercício nestes danos, nós avaliamos o conteúdo estriatal da enzima TH, de DA e de seus metabólitos. A ANOVA indicou um efeito significativo para o tratamento com MPTP nos níveis estriatais de TH ($F_{1,12}=16,8$, $P < 0,05$, Figura 26B) e DA ($F_{1,29}=116$, $P < 0,05$, Figura 26C). Em relação ao *turnover* dopaminérgico (Figura 26D), a ANOVA indicou efeitos significantes para os fatores tratamento ($F_{1,29}=35,0$, $P < 0,05$), exercício ($F_{1,29}=7,4$, $P < 0,05$) e para a interação entre os dois fatores ($F_{1,29}=4,6$,

$P < 0,05$). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls confirmou que o MPTP reduziu os níveis de TH e DA no estriado (Figura 26B-C) como observado anteriormente (Prediger, Aguiar *et al.*, 2010), assim como aumentou o seu *turnover* (Figura 26D). O exercício diminuiu o *turnover* dopaminérgico no estriado dos dois grupos de animais exercitados (salina e MPTP, Figura 26D). Quanto à captação de DA, não foram encontradas diferenças significativas nos sinaptossomas isolados do estriado de animais sedentários ou exercitados ($t_{0,05,8}=0,07$, $P=0,9$, Figura 26E).

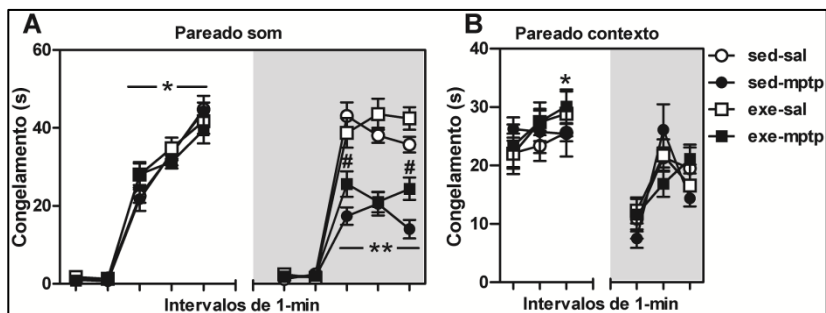


Figura 25. Os efeitos do exercício sobre os prejuízos na memória de procedimento de camundongos induzidos pela administração intranasal de MPTP avaliados pelo medo condicionado ao som. Na tarefa do medo pareado, o MPTP prejudicou a evocação desta memória quando pareado ao som (A), mas não ao contexto (B). Este prejuízo é menos severo nos animais exercitados (A). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. Primeira avaliação, ** $P < 0,05$ vs. sal, e # $P < 0,05$ vs. sed-MPTP (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni). Exe – exercício; IC – intervalo de confiança; Sed – sedentário.

Quanto à função mitocondrial, o exercício físico aumentou significativamente a atividade do complexo I das mitocôndrias isoladas do tecido cerebral ($t_{0,05,13}=7,8$, $P < 0,05$, Figura 27A esquerda), enquanto a atividade da citrato sintase não sofreu modificação ($t_{0,05,13}=0,3$, $P=0,7$, Figura 27A direita). Entretanto, a taxa entre estes dois marcadores de função mitocondrial foi significativamente aumentada pelo exercício físico ($t_{0,05,12}=37,9$, $P < 0,05$, Figura 27B), sugerindo um aumento da biogênese mitocondrial (Waters, Rotevatn *et al.*, 2004; Ikeda, Kawamoto *et al.*, 2006). A inibição do complexo I das mitocôndrias isoladas pela incubação com rotenona ($5 \mu\text{M}$ $t_{0,05,16}=3,9$, $P < 0,05$) e MPP^+ ($0,5 \text{ mM}$ $t_{0,05,16}=2,1$, $P < 0,05$) foi significativamente menor no grupo exercício em relação ao seu grupo controle sedentário. Entretanto o exercício não foi capaz de prevenir a inibição causada pela maior concentração de MPP^+ ($2,5 \text{ mM}$ $t_{0,05,16}=0,3$, $P=0,7$) (Figura 27C).

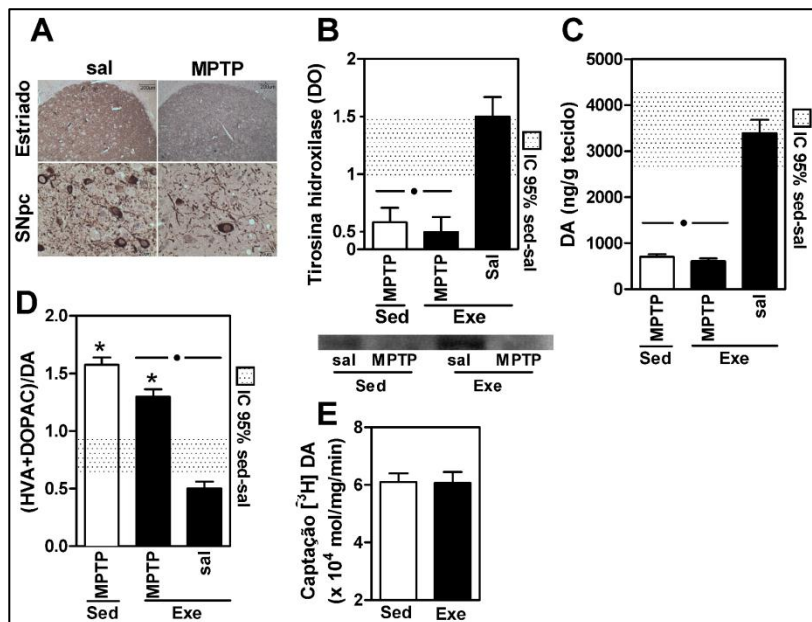


Figura 26. O exercício não protege a degeneração nigro-estriatal induzida pela administração intranasal de MPTP em camundongos. O MPTP causou redução na marcação para tirosina hidroxilase (TH) no estriado (A-D) e *SNpc* (B). O exercício não preveniu esta redução na marcação para TH, mas diminuiu o *turnover* dopaminérgico estriatal (C). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P < 0,5$ vs. controle e * $P < 0,05$ vs. fator exercício [teste t de Student (F-G) ou ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (B, C e H)]. CS – citrato sintase; DO – densidade óptica; DOPAC – ácido dihidroxifenilacético; Exe – Exercício; HVA – ácido homovanílico; Sed – Sedentário; *SNpc* – *substantia nigra pars compacta*. Figura A (imunossuavizada do estriado e *SNpc*) retirada de Prediger *et al.* (2010), uso permitido pela Springer Publishing Co. (licença n° 2704191063384).

4.8. O exercício aumenta a hipotermia induzida pelo MPTP: possível relação com sua atividade antioxidante

As respostas hipertérmicas ao exercício agudo são conhecidas de longa data (Hart e Heroux, 1955; Morgan, Kao *et al.*, 1955). No modelo de exercício utilizado nesta tese, a ANOVA com medidas repetidas demonstrou que a resposta hipertérmica aguda ao exercício ($F_{3,17}=27$, $P < 0,05$, Figura 28A) se extingue em aproximadamente 2 h após o término da corrida ($F_{2,24}=4$, $P < 0,05$, Figura 28A). Quanto ao tratamento intranasal com MPTP, os animais apresentaram uma resposta aguda de hipotermia ($F_{7,154}=2,8$, $P < 0,05$, Figura 28B), como descrito anteriormente para outras doses e vias de administração desta toxina (Freyaldenhoven, Ali *et al.*, 1995; Rojo, Montero *et al.*, 2006). De modo emblemático, esta resposta hipotérmica

ao MPTP foi significativamente maior nos animais exercitados, após 4 e 6 h da administração intranasal de MPTP, de acordo com a análise *post-hoc* de Bonferroni ($F_{3,17}=27$, $P<0,05$, Figura 28B).

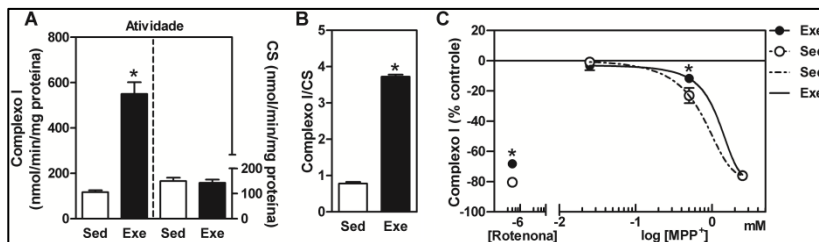


Figura 27. Avaliação da inibição da atividade do complexo I induzida por rotenona e MPP⁺ em mitocôndrias isoladas do cérebro de camundongos exercitados. O exercício aumentou a atividade do complexo I mitocondrial cerebral (A), provavelmente através de biogênese mitocondrial (B). Além disso, o exercício diminuiu a inibição do complexo I induzida pela rotenona e MPP⁺ (C). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P<0,5$ vs. controle e [teste t de *Student* (A e B) ou ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (C)]. CS – citrato sintase; Exe – Exercício; Sed – Sedentário.

Seis h após o tratamento com MPTP, a ANOVA indicou um efeito significativo para o fator exercício ($F_{1,61}=4,6$, $P>0,05$, Figura 29D) e a sua interação com o tratamento ($F_{1,61}=6,5$, $P>0,05$, Figura 29D) na atividade estriatal da enzima GPx. A análise *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou uma menor atividade desta enzima no estriado dos animais sedentários tratados com MPTP, e maior atividade nos animais exercitados. No mesmo tempo de análise, foi observada um aumento na produção estriatal de H_2O_2 . A ANOVA indicou um efeito significativo para a interação entre os fatores tratamento vs. exercício ($F_{1,61}=13,7$, $P<0,05$, Figura 29A), e o teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou menor produção de H_2O_2 no estriado dos animais exercitados. Em adição, o MPTP aumentou significativamente a fluorescência pra DCFH-DA nos animais sedentários, sendo este parâmetro reduzido significativamente nos animais exercitados ($F_{1,61}=26,6$, $P<0,05$, Figura 29A).

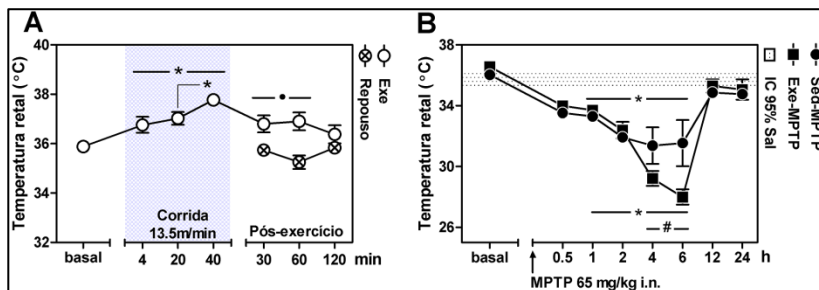


Figura 28. Os efeitos do exercício agudo e da administração intranasal de MPTP sobre a temperatura retal de camundongos. O exercício agudo aumentou temporariamente a temperatura corporal de animais (A). Entretanto, 4-6 h após o tratamento intranasal com MPTP, os animais exercitados apresentaram maiores respostas de hipotermia do que seus controles sedentários (B). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. 1ª medida, # $P < 0,05$ vs. sed-MPTP (ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Bonferroni). Exe – exercício; IC – intervalo de confiança; Sed – sedentário.

Após 6 h do tratamento com MPTP, a ANOVA demonstrou um efeito significativo para o fator tratamento ($F_{1,36}=10,2$, $P < 0,05$, Figura 29C) quanto ao conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) estriatal. Em relação à atividade da enzima GR estriatal, a ANOVA revelou uma interação entre os fatores exercício e tratamento ($F_{1,61}=18,1$, $P < 0,05$, Figura 29B), e a comparação *post-hoc* de Newman-Keuls indicou um aumento significativo na atividade da GR no grupo exercitado tratado com MPTP em relação ao seu controle sedentário.

Além disso, a análise de covariância (ANCOVA) demonstrou que a hipotermia induzida pelo MPTP foi dependente dos efeitos do exercício na (i) produção de H_2O_2 ($F_{1,13}=10,7$, $P < 0,05$), medido pelo DCFH-DA estriatal, e (ii) conteúdo estriatal de GSH ($F_{1,13}=6,1$, $P < 0,05$). Estes resultados demonstram que conteúdo de GSH e a produção de H_2O_2 no estriado, em animais previamente exercitados e/ou tratados com MPTP, são variáveis importantes na modulação das respostas de hipotermia em camundongos.

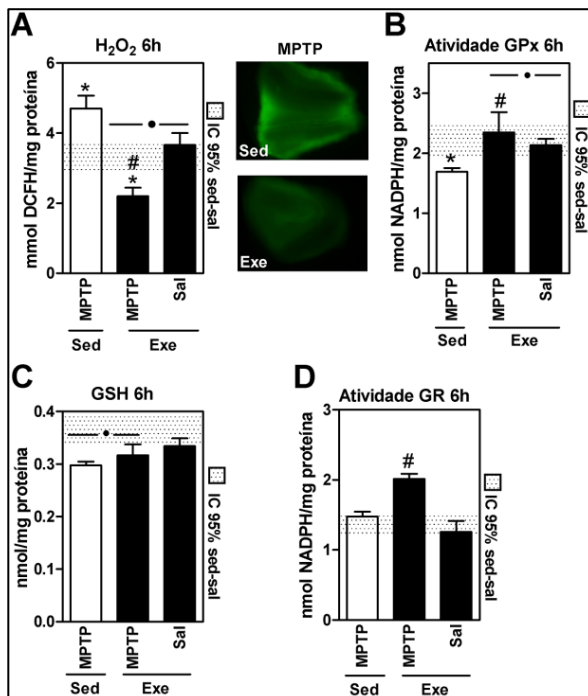


Figura 29. Os efeitos do exercício sobre a atividade antioxidante dependente de glutatona no estriado dos camundongos após 6 h do tratamento intranasal com MPTP. O exercício aumentou as defesas antioxidantes no estriado dos camundongos (B e D) que foi acompanhada pela redução na produção de peróxidos nesta estrutura (A). Os níveis de GSH são reduzidos após o tratamento com MPTP (C). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. Controle, $\bullet P < 0,5$ vs. fator exercício ou MPTP, # $P < 0,05$ vs. sed-MPTP (ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). DCFH – diclorofluoresceína; Exe – exercício; GPx – glutatona peroxidase; GR – glutatona redutase; gsh – glutatona; H_2O_2 – peróxido de hidrogênio; IC – intervalo de confiança; NADPH – fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo; Sed – sedentário.

4.9. O exercício previne a super-sensibilidade dos receptores dopaminérgicos do tipo D_2 após a administração intranasal de MPTP

A ANOVA para valores repetidos e o teste *post-hoc* de Newman-Keuls confirmaram que o tratamento com R(-)-apomorfina (0,2 mg/kg, s.c.), um agonista misto dos receptores D_1 e D_2 para DA, aumentou significativamente o comportamento de escalada em todos os animais em relação ao período de habituação ($F_{1,54}=162,6$, $P < 0,05$, Figura 30A). Entretanto, o tratamento intranasal com MPTP aumentou de maneira significativa este comportamento ($F_{1,54}=231,1$, $P < 0,05$, Figura 30A), como

descrito anteriormente em outros modelos de Parkinsonismo induzidos pela administração sistêmica de MPTP (Sundstrom, Fredriksson *et al.*, 1990; Spooren, Vassout *et al.*, 1998).

No desafio com o antagonista preferencial dos receptores D₂ para DA haloperidol (0,32 mg.kg, i.p.), o teste do Qui-quadrado (χ^2) demonstrou que a frequência da postura cataleptica a esta dose foi significativamente diferente entre os grupos ($\chi_{3,0,05}=11,5$, $P<0,05$, Figura 30B). Em relação ao tratamento intranasal com MPTP, a frequência de catalepsia foi significativamente maior nos sedentários ($\chi_{1,0,05}=5,5$, $P<0,05$), mas não nos exercitados ($\chi_{1,0,05}=0,9$, $P<0,05$), quando comparados aos seus respectivos controles tratados com salina (Figura 30B). Quando avaliado a severidade da catalepsia apenas nos animais que a desenvolveram (Figura 30C), o teste de Kruskal-Wallis acusou diferença significativa entre os grupos ($H_{3,51}=3,7$, $P<0,05$, Figura 30B), e o exame *post-hoc* de Dunns revelou que os escores de catalepsia foram significativamente maiores nos animais sedentários tratados com MPTP do que em seus respectivos controles. Isto não ocorreu nos animais exercitados tratados com MPTP, que apresentaram catalepsias menos severas que seus controles sedentários (Figura 30B).

Para esclarecer estes achados, os animais foram desafiados com uma dose sub-efetiva do agonista de receptores D₂ e D₃ para DA (-)-quinpirole (10 µg/kg, i.p., Figura 30E-F), uma análise possível devido à ausência de diferenças dos níveis de locomoção neste modelo experimental ($F_{1,30}=0,59$, $P=0,44$, Figura 30D), como descrito anteriormente para este modelo de Parkinsonismo (Prediger, Aguiar *et al.*, 2010). O teste ANOVA revelou uma interação significativa entre os fatores exercício e tratamento nas alterações de locomoção induzidas pelo (-)-quinpirole ($F_{1,30}=5,6$, $P<0,05$, Figura 30F). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou um aumento na locomoção nos animais sedentários tratados com MPTP após tratamento com (-)-quinpirole, como previamente descrito na literatura em outros modelos de Parkinsonismo (Gnanalingham, Erol *et al.*, 1995; Treseder, Smith *et al.*, 2000; Archer, Palomo *et al.*, 2003). Entretanto, o mesmo fenômeno não foi observado nos animais previamente exercitados.

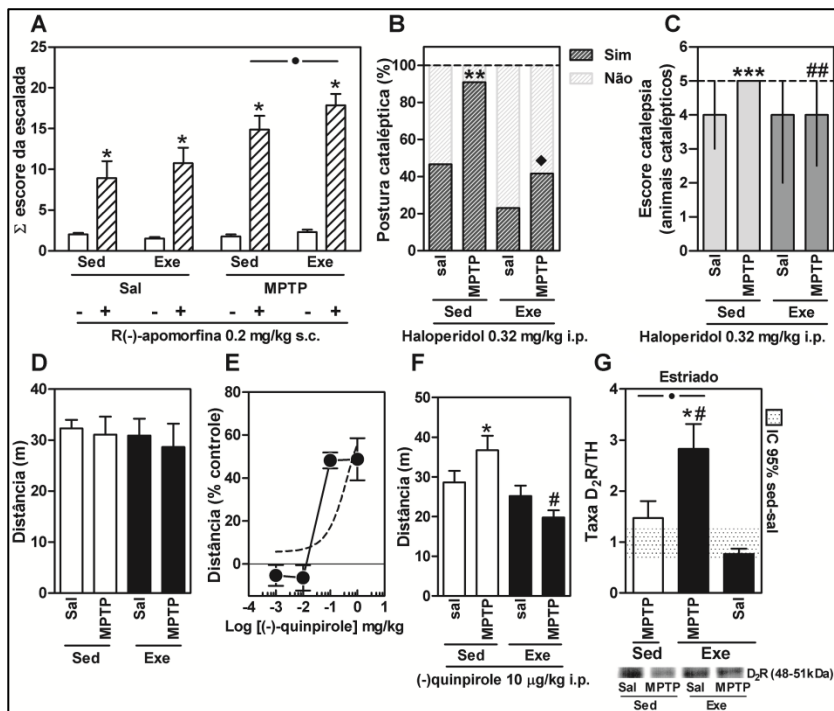


Figura 30. Os efeitos do exercício sobre os desafios farmacológicos com R(-)-apomorfina, haloperidol e (-)-quinpirole nos camundongos tratados com MPTP intranasal. Os animais tratados com MPTP apresentaram um aumento pronunciado no comportamento de escalada quando tratados com R(-)-apomorfina (0,2 mg/kg, s.c.), sendo que esta resposta não é afetada pelo exercício (A). Na catalepsia induzida pelo haloperidol (0,32 mg/kg, i.p.), o exercício diminuiu a frequência (B) e a severidade (C) da catalepsia nos animais tratados com MPTP. Os animais sedentários tratados com MPTP também responderam a uma dose subefetiva (E) do agonista (-)-quinpirole (F). E a densidade dos receptores D₂ para DA no estriado diminuiu nos animais sedentários após o tratamento com MPTP, mas não nos animais exercitados (G). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média (A, D-G), % do grupo (B), e mediana \pm intervalo interquartil (C). * P<0,05 vs. Controle ou veículo; • P<0,5 fator exercício; e # P<0,05 vs. sed-MPTP (ANOVA seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls). ** P<0,05 vs sed-sal e ♦ P<0,05 vs sed-MPTP (Qui-quadrado) *** P<0,05 vs sed-sal e ## P<0,05 vs. sed MPTP (Kruskal-Wallis seguido do teste post-hoc de Dunns). Exe – exercício; IC – intervalo de confiança; Sed – sedentário. TH – tirosina hidroxilase.

Quanto à densidade dos receptores D₂ para DA no estriado destes animais, a ANOVA revelou uma interação significativa entre os fatores Exercício vs. tratamento ($F_{1,15}=5,7$, $P<0,05$). Na análise *post-hoc* de Newman-Keuls indicou uma diminuição da densidade destes receptores no estriado dos animais sedentários tratados com MPTP, mas não nos animais exercitados. Quando relacionado à densidade deste receptor ao conteúdo da enzima TH (Figura 30G), a ANOVA identificou diferenças significativas

quanto ao fator tratamento ($F_{1,16}=13,2$, $P<0,05$, Figura 30G) e à sua interação com o exercício físico ($F_{1,16}=4,8$, $P<0,05$, Figura 30G). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls revelou aumento na proporção dos receptores D_2 no estriado dos animais tratados com MPTP, sendo esta relação o dobro nos animais exercitados (Figura 30G). Estes resultados sugerem que os camundongos tratados com MPTP desenvolvem maior sensibilidade aos fármacos dopaminérgicos com alvo nos receptores D_2 para DA enquanto o exercício previne estas respostas.

4.10. O tratamento crônico com L-DOPA reduz a assimetria motora nos camundongos hemiparkinsonianos

Quatro semanas após a administração intra-estriatal de 6-OHDA no experimento 3 verificou-se uma redução de aproximadamente 70% no conteúdo de TH no estriado lesionado (direito) ($t_{0,05;8}=3,1$, $P<0,05$, Figura 31A), que causou um aumento significativo na assimetria ao desafio com R(-)-apomorfina ($t_{0,05;8}=6,3$, $P<0,05$, Figura 31B) e na tarefa do cilindro ($F_{2,26}=3,7$, $P<0,05$, Figura 31C). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que o tratamento com L-DOPA (25 mg/kg, i.p.) durante 2 semanas foi capaz de diminuir a assimetria na tarefa do cilindro, independente do estado atlético do animal ($F_{2,26}=3,7$, $P<0,05$, Figura 31C).

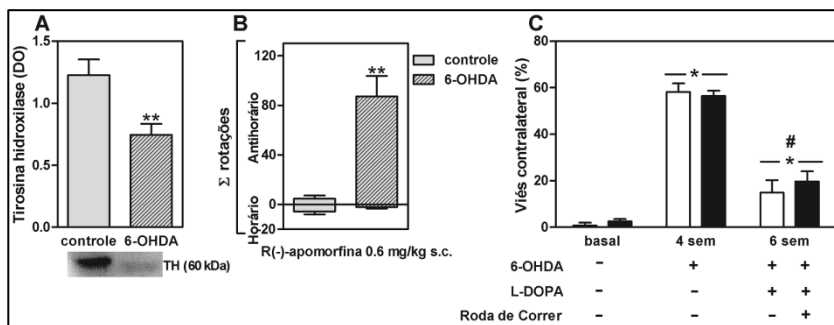


Figura 31. Os prejuízos motores causados pela administração intra-estriatal de 6-OHDA são atenuados pela L-DOPA. A 6-OHDA induziu neurodegeneração (A) e assimetria nos animais (B,C), que foi parcialmente revertido pela L-DOPA (C). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. ** $P<0,5$ vs. controle (teste t de Student) e * $P<0,05$ vs. basal ou # $P<0,05$ vs. 4 semanas (ANOVA com medidas repetidas seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). DO – densidade óptica, Exe – Exercício; Sed – Sedentário.

4.11. O exercício físico atenua as discinesias e as alterações na transmissão glutamatérgica e sinalização intracelular induzidas pelo tratamento crônico com L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos

A ANOVA para medidas repetidas demonstrou que os camundongos hemiparkinsonianos desenvolveram discinesias de patas, axiais e oro-linguais ($F_{3,48}=27,8$, $P<0,05$, Figura 32A) e de locomoção ($F_{3,66}=5,1$, $P<0,05$, Figura 32B) após 14 dias de tratamento repetido com L-DOPA (25 mg/kg, i.p.) e benserazida (12,5 mg/kg, i.p.), conforme descrito anteriormente na literatura (Lundblad, Picconi *et al.*, 2004; Pavon, Martin *et al.*, 2006). A análise *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que a severidade destas discinesias foi significativamente menor nos animais com livre acesso às rodas de correr (Figuras 32A e B). Os movimentos anormais observados puderam ser associados às discinesias induzidas pela L-DOPA, uma vez que a amantadina (40 mg/kg, i.p.), um fármaco utilizado clinicamente no tratamento das discinesias (Lundblad, Usiello *et al.*, 2005; Ding, Restrepo *et al.*, 2007), diminuiu estes comportamentos ($F_{1,20}=26,4$, $P<0,05$, Figura 32E). O controle motor das tarefas, realizados pela análise dos escores de levantamentos ($t_{0,05;12}=1,2$, $P=0,27$, Figura 32C) e de auto-limpeza ($t_{0,05;12}=0,46$, $P=0,64$, Figura 32C), assim como os valores totais de locomoção ($F_{2,16}=0,26$, $P=0,76$, Figura 32D), não demonstraram diferenças estatísticas entre animais sedentários e exercitados.

Além disso, as discinesias induzidas pela L-DOPA foram acompanhadas de aumento da liberação de Glu (sed *vs.* 100% $t_{0,05;9}=11,7$, exe *vs.* 100% $t_{0,05;11}=4,9$, $P<0,05$ Figura 33A) e da fosforilação do sítio Thr75 (sed *vs.* 100% $t_{0,05;4}=3,9$, exe *vs.* 100% $t_{0,05;4}=4,1$, $P<0,05$, Figura 33B esquerda) no estriado lesionado com 6-OHDA(direito), quando comparados ao estriado controle não lesionado (esquerdo, 100%). Entretanto, o exercício diminuiu significativamente a liberação de Glu ($t_{0,05;20}=5,9$, $P<0,05$, Figura 33A) e a fosforilação da DARPP-32-Thr75 ($t_{0,05;8}=3,3$, $P<0,05$, Figura 33A direito) no estriado lesionado quando comparado aos controles sedentários.

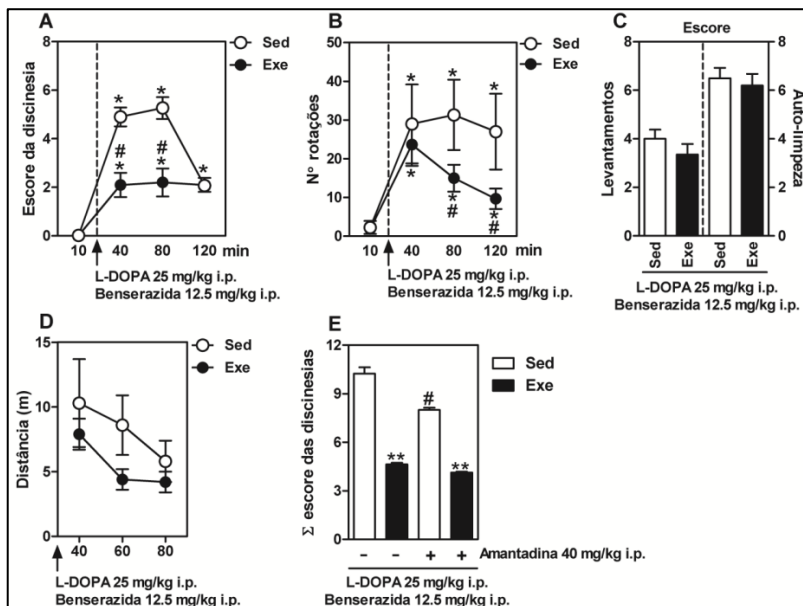


Figura 32. Os efeitos do exercício nas discinesias induzidas pela L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos. O tratamento com L-DOPA durante 14 dias induziu discinesias de patas, axiais e orofaciais (A) e de locomoção (B), que foram atenuadas pelo exercício e o tratamento com amantadina (A e B). O controle farmacológico (E) e motor (C e D) não indicaram diferenças entre os animais sedentários e exercitados. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. basal 10 min e # $P < 0,5$ vs. Sed (** $P < 0,05$ vs. veículo (ANOVA seguido do teste *post-hoc* de Newman-Keuls). Exe – exercício; Sed – sedentário.

Além disso, os animais sedentários (e discinéticos) apresentaram um aumento na fosforilação da DARPP-32-Thr34 (vs. 100% $t_{0,05;4}=6,5$, $P < 0,05$, Figura 33B esquerdo) e dos níveis de cFos (vs. 100% $t_{0,05;4}=7,7$, $P < 0,05$, Figura 33C) no estriado lesionado quando comparado ao estriado controle (esquerdo, 100%). De modo interessante, os animais exercitados não apresentaram estas alterações [(DARPP-32-Thr34: vs. 100% $t_{0,05;4}=0,8$, $P=0,45$, Figura 33C); (vs. 100% cFos: $t_{0,05;4}=2,4$, $P=0,07$, Figura 33C)], sendo que os níveis de fosforilação da DARPP-32-Thr34 ($t_{0,05;6}=4,5$, $P < 0,05$, Figura 33B esquerdo) e de cFos ($t_{0,05;8}=7,1$, $P < 0,05$, Figura 33D) no estriado lesionado destes animais foram significativamente menores que os de seus controles sedentários

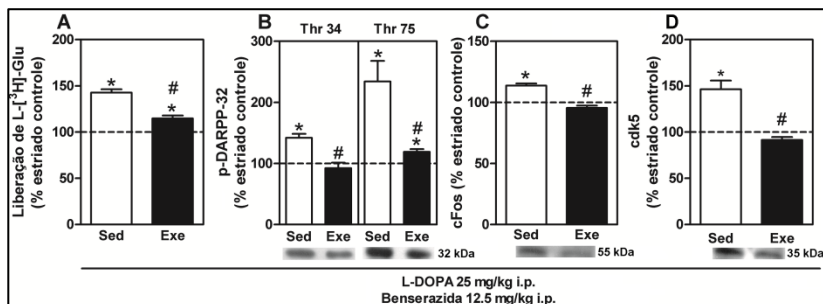


Figura 33. Os efeitos do exercício sobre as alterações na neurotransmissão glutamatérgica e sinalização intracelular induzidas pelo tratamento crônico com L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos. O tratamento durante 14 dias com L-DOPA em camundongos lesionados unilateralmente com 6-OHDA promove um aumento na liberação de glutamato (A), dos níveis de cFos (C) e cdk5 (D), e da fosforilação dos sítios Thr34 e 75 da DARPP-32 (B) no estriado lesionado. Estas modificações foram atenuadas pelo exercício. Os valores estão expressos em média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. 100% e # $P < 0,05$ vs. Sed (teste t de Student). DARPP-32 – fosfoproteína regulada por DA e AMPc de 32 KDa; Exe – Exercício; Glu – glutamato; Sed – Sedentário.

5. DISCUSSÃO

As principais hipóteses desta tese foram baseadas em recentes evidências demonstrando a capacidade do exercício físico em promover neuroplasticidade e neuroproteção em animais de laboratório. Neste trabalho, estas características foram investigadas em modelos experimentais de Parkinsonismo induzidos pelas neurotoxinas 6-OHDA e MPTP em camundongos, e as consequentes disfunções motoras e não-motoras, super-sensibilidade de receptores dopaminérgicos, e discinesias induzidas pelo tratamento crônico com L-DOPA. Os resultados do presente estudo indicam que os prejuízos cognitivos e motores (mas não os sintomas olfatórios) verificados nos modelos de Parkinsonismo utilizados foram atenuados quando os animais foram previamente submetidos a programas de exercício físico. De modo inédito, os resultados obtidos neste estudo demonstram o potencial protetor do exercício físico contra o desenvolvimento das discinesias induzidas pelo tratamento crônico com L-DOPA que podem ser de grande relevância clínica, obviamente caso confirmados em estudos em humanos. Estes efeitos benéficos do exercício nos modelos experimentais investigados parecem estar associados tanto a uma proteção da degeneração da via dopaminérgica nigro-estriatal, quanto a mecanismos de neuroplasticidade sináptica (ex: liberação de Glu e sensibilidade de receptores dopaminérgicos) e intracelular [ex: mitocondrial e via cdk5-DARPP-32-thr(75)].

É importante ser destacado que os resultados encontrados reforçam a validade dos modelos experimentais de Parkinsonismo utilizados nesta tese, uma vez que os animais apresentaram várias características comportamentais e neuroquímicas semelhantes às aquelas observadas em pacientes com a DP, como a (i) neurodegeneração dopaminérgica da via nigro-estriatal, (ii) prejuízos sensoriais, cognitivos e motores (Becker, Muller *et al.*, 2002; Chaudhuri, Healy *et al.*, 2006; Fujimoto, 2009), e (iii) boa resposta a L-DOPA (Cotzias, 1968; Muentner e Tyce, 1971; Hornykiewicz, 2002), à agonistas dopaminérgicos (no caso o (-)-quinpirole) (Lieberman, Gopinathan *et al.*, 1983; Jenner, 1995), e até mesmo ao próprio exercício físico (Tabela 3, página 19). No mesmo sentido, os ergômetros escolhidos neste trabalho – esteira e rodas de correr – para modelar experimentalmente o exercício causaram modificações atléticas semelhantes às aquelas descritas na literatura, como aumento progressivo da quantidade de exercício e adaptações mitocondriais musculares (Barnard, Edgerton *et al.*, 1970; Van Praag, Kempermann *et al.*, 1999; Allen, Harrison *et al.*, 2001; Navarro, Gomez *et al.*, 2004; Ikeda, Kawamoto *et al.*, 2006; Al-Jarrah, Pothakos *et al.*, 2007; Aguiar, Boemer *et al.*, 2010).

Por muitos anos, a crença na prevenção e/ou desaceleração da DP estimulou a recomendação de exercícios físicos para os pacientes parkinsonianos. Hoje, a literatura científica já estabeleceu o seu uso como uma abordagem paliativa e segura para pacientes com DP (ver Tabela 3, página 19), assim como em muitas outras condições envolvendo lesões do SNC, como a esclerose lateral amiotrófica, a doença de Huntington, e o acidente vascular cerebral (Mattson, 2000; Smith e Zigmond, 2003). Além disso, apesar dos problemas metodológicos envolvendo estudos epidemiológicos sobre os efeitos do exercício, trabalhos recentes demonstraram de maneira consistente a diminuição do risco para o desenvolvimento da DP em pessoas com história pregressa de exercício regular (Chen, Zhang *et al.*, 2005; Logroscino, Sesso *et al.*, 2006; Xu, Park *et al.*, 2010).

No segmento experimental, dois pequenos trabalhos haviam investigado a hipótese neuroprotetora do exercício, ambos com limitações experimentais. O primeiro deles apresenta sérios problemas metodológicos, sugerindo os efeitos protetores das rodas de correr em ratos com o feixe prosencefálico medial lesionado pela injeção de 6-OHDA (Mabandla, Kellaway *et al.*, 2004). Nosso grupo desenvolveu o segundo trabalho (Aguar, Araujo *et al.*, 2009), em ratos tratados sistemicamente com diferentes doses de reserpina, para modelar prejuízos motores (reserpina 5 mg/kg, s.c.) e não motores (reserpina 1 mg/kg, s.c.). Estudos anteriores haviam demonstrado que uma única injeção destas doses de reserpina (5 ou 1 mg/kg) reduzia os níveis extracelulares de DA para, respectivamente, 4% e 10% dos níveis controle, após 24 h do tratamento (Boulton, Juorio *et al.*, 1977; Kannari, Tanaka *et al.*, 2000). Estes resultados sugerem que o exercício pode prevenir o desenvolvimento de prejuízos funcionais associados à depleção de DA. Embora o uso de reserpina como um modelo experimental da DP apresente boa validade de semelhança e preditiva, ela não induz a degeneração da via dopaminérgica nigro-estriatal, ao contrário das neurotoxinas 6-OHDA e MPTP. No trabalho atual, a densidade da marcação para TH foi drasticamente reduzida no estriado dos animais tratados com 6-OHDA ou MPTP. Além disso, foi possível verificar a diminuição do número de neurônios marcados positivamente para esta enzima na *SNpc* dos camundongos que tiveram o estriado lesionado com 6-OHDA, e a diminuição da quantidade de DA no estriado dos animais tratados com MPTP intranasal.

Os prejuízos motores e cognitivos avaliados neste trabalho reforçaram os achados da neurodegeneração da via nigro-estriatal após o tratamento com as neurotoxinas 6-OHDA e MPTP. Os núcleos da base são descritos de longa data como um centro motor, devido a antigas evidências

post-mortem sobre distúrbios envolvendo movimentos involuntários, desde hipocinéticos até hipercinéticos, na lesão desta região (Vogt, 1911; Wilson, 1912; 1914; Villablanca e Marcus, 1975). O rota-rod é um teste utilizado amplamente para a avaliação experimental da função motora de roedores (Kitabatake, Hikida *et al.*, 2003; Jiang, Wan *et al.*, 2004; Petzinger, Walsh *et al.*, 2007). O prejuízo no desempenho no rota-rod havia sido descrito em ratos com lesão unilateral do feixe prosencefálico medial induzido pela 6-OHDA (Padovan-Neto, Echeverry *et al.*, 2009), e também em outros modelos de Parkinsonismo, como a reserpina (Aguiar, Araujo *et al.*, 2009), a rotenona (Swarnkar, Singh *et al.*, 2010), o paraquat (Kang, Gil *et al.*, 2010), e o MPTP (Jiang, Wan *et al.*, 2004; Hong, Wang *et al.*, 2007; Moon, Kim *et al.*, 2009). Já o efeito *per se* do exercício físico na melhora do desempenho nesta tarefa, representa uma importante propriedade do exercício na melhoria do controle e coordenação dos movimentos, devido a alterações neuroplásticas para o melhor processamento espaço-temporal (Latash e Anson, 2006; Bonacci, Chapman *et al.*, 2009).

Os resultados atuais sugerem que os camundongos treinaram a uma intensidade submáxima (ou moderada), pois o $\dot{V}O_2$ manteve-se constante frente ao aumento semanal da sobrecarga de exercício, manipulado pelo tempo ou pela velocidade de corrida. Por outro lado, os benefícios cognitivos e motores do exercício são observados em situações de prejuízos destas funções (Cotman e Berchtold, 2002; Aguiar e Prediger, 2010), como no envelhecimento (Samorajski, Rolsten *et al.*, 1987; Navarro, Gomez *et al.*, 2004) ou em doenças neurológicas (Petajan, Gappmaier *et al.*, 1996; Aguiar, Tuon *et al.*, 2008). Os resultados atuais corroboram a literatura existente nesta área, pois a lesão com 6-OHDA prejudicou a coordenação motora dos animais, enquanto o exercício aumentou o desempenho geral destes no rota-rod.

Entretanto, não foi possível observar diferenças específicas entre os animais sedentários e exercitados lesionados com 6-OHDA. Isto foi observado em outra tarefa comportamental: a tarefa do cilindro. Nesta tarefa, a assimetria induzida pela lesão com 6-OHDA foi menor nos animais previamente exercitados, nos dois pontos de corte avaliados (2 e 4 semanas após a lesão). Trabalhos prévios haviam descrito efeitos similares do exercício, mas como estratégia restauradora, no mesmo modelo experimental de Parkinsonismo (Yoon, Shin *et al.*, 2007; Tajiri, Yasuhara *et al.*, 2010). Em conjunto, os resultados obtidos nos testes do rota-rod e do cilindro sugerem fortemente que o exercício é capaz de atenuar o desenvolvimento dos prejuízos motores e da neurodegeneração da via nigro-estriatal induzidos pela administração intra-estriatal de 6-OHDA, uma das hipóteses originais deste trabalho. Além disso, estes resultados

reforçam a neuroplasticidade induzida pelo exercício aos núcleos da base, algo que ainda é objeto de pouca investigação até o momento.

Embora os núcleos da base de mamíferos tenham sido amplamente associados ao comportamento motor, atualmente é sabido que estes núcleos (principalmente o estriado dorsal) participam da modulação de processos cognitivos (Packard e Knowlton, 2002; Da Cunha, Wietzikoski *et al.*, 2009). Anatomicamente, estas estruturas subcorticais estão envolvidas principalmente em uma alça córtex → núcleos da base → tálamo → córtex, cujo maior eixo é composto sequencialmente pelo estriado, globo pálido, SN, e núcleo ventral talâmico (Parent e Hazrati, 1995). Devido à sua privilegiada relação com o córtex, neurônios de diferentes regiões corticais convergem para o estriado, e estas associações formam unidades funcionais que codificam diferentes partes do corpo, objetos, locais e representações simbólicas (Da Cunha, Wietzikoski *et al.*, 2009), mediando processos de aprendizagem e memória em que estímulos-respostas, associações ou hábitos são adquiridos de forma gradual (Packard e Knowlton, 2002; Da Cunha, Wietzikoski *et al.*, 2009). Evidências clínicas em pacientes com doenças neurodegenerativas envolvendo esta circuitaria, como a DP (Stebbins, Gabrieli *et al.*, 1999), bem como estudos experimentais (Da Cunha, Angelucci *et al.*, 2002; Prediger, Batista *et al.*, 2006; Tadaiesky, Dombrowski *et al.*, 2008; Prediger, Aguiar *et al.*, 2011) e de neuroimagem funcional (Dagher, Owen *et al.*, 2001; Lewis, Dove *et al.*, 2003), fortalecem o papel dos núcleos da base na modulação de processos cognitivos.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa e outros autores demonstraram prejuízos de memórias implícitas em roedores após o tratamento com MPTP no labirinto aquático de Morris, uma tarefa dependente do circuito fronto-estriatal (Miyoshi, Wietzikoski *et al.*, 2002; Pothakos, Kurz *et al.*, 2009; Prediger, Aguiar *et al.*, 2010; Prediger, Aguiar *et al.*, 2011). No trabalho atual, nós confirmamos estes prejuízos no mesmo paradigma comportamental. De maneira inédita, observamos que os animais previamente exercitados apresentaram melhor desempenho geral na versão de procedimento do labirinto aquático, mesmo quando tratados com MPTP pela via intranasal. Recentemente, foi descrito pelo nosso grupo que o desempenho nesta tarefa estava prejudicado em camundongos após exercício intenso durante dois meses em esteira (Aguiar, Boemer *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem que o domínio cognitivo dos núcleos da base também responde plasticamente ao exercício físico, de modo otimizado no exercício de intensidade moderada, semelhante ao sugerido recentemente por Chaddock (2010). Em adição, nós submetemos os animais a uma tarefa cognitiva de estímulo-associação, o medo pareado ao som que sabidamente é dependente do estriado (Ferreira, Moreira *et al.*, 2003; Ferreira, Shammah-

Lagnado *et al.*, 2008). Os danos estriatais induzido pelo MPTP prejudicaram a evocação das respostas de medo associadas ao som. Quanto ao exercício, Falls *et al.*, (2010) demonstraram previamente melhor aprendizado nesta mesma tarefa em camundongos exercitados durante duas semanas em rodas de correr, sem nenhum efeito na evocação após 24 h. No presente estudo, o treinamento com esteira durante 6 semanas não apresentou nenhum efeito *per se* no condicionamento e teste dos animais, mas atenuou os prejuízos na evocação das respostas de medo induzidos pelo tratamento intranasal com MPTP. Em conjunto, estes resultados reforçam o papel do exercício na proteção contra prejuízos cognitivos observados após lesão estriatal induzida pelo tratamento intranasal com MPTP.

Quanto à hipótese neuroprotetora do exercício aos danos causados pelos tratamentos com 6-OHDA ou MPTP, os resultados atuais refletiram os achados contrastantes existentes na literatura sobre os efeitos do exercício físico em modelos experimentais de Parkinsonismo (Tabela 7, Apêndice I). Quando a 6-OHDA é escolhida como modelo experimental de Parkinsonismo, os resultados atuais demonstram que a neurodegeneração nigro-estriatal é menor nos animais exercitados. Isto também foi observado em trabalhos prévios quando o exercício foi utilizado como estratégia restauradora (isto é após a lesão com 6-OHDA) (Tillerson, Caudle *et al.*, 2003; Poulton e Muir, 2005; Yoon, Shin *et al.*, 2007; Tajiri, Yasuhara *et al.*, 2010). Entretanto, apesar da atenuação dos prejuízos cognitivos observados nos animais exercitados tratados com MPTP intranasal, estes benefícios não foram associados a uma proteção da lesão estriatal neste modelo de Parkinsonismo. De modo semelhante, a capacidade do exercício físico em melhorar os prejuízos motores em camundongo tratados sistemicamente com MPTP também não está associada a respostas neuroprotetoras na via dopaminérgica nigro-estriatal (Fisher, Petzinger *et al.*, 2004; Al-Jarrah, Pothakos *et al.*, 2007; Petzinger, Walsh *et al.*, 2007; Vuckovic, Wood *et al.*, 2008; Al-Jarrah, Jamous *et al.*, 2010; Gerecke, Jiao *et al.*, 2010; Gorton, Vuckovic *et al.*, 2010; Lau, Patki *et al.*, 2011; Smith, Goldberg *et al.*, 2011). A ausência de efeitos do exercício no prejuízo de discriminação olfatória dos animais tratados com MPTP intranasal, um marcador precoce de fases pré-clínicas da DP (Becker, Muller *et al.*, 2002; Jankovic, 2008; Prediger, Rial *et al.*, 2009; Prediger, Aguiar *et al.*, 2011), reforçam a ausência de neuroproteção induzida pelo exercício frente a esta neurotoxina.

Os efeitos do exercício em modelos de disfunção mitocondrial do SNC ainda são objeto de pouca investigação, mas de muita especulação na direção neuroprotetora do exercício (Boveris e Navarro, 2008; Kaliman, Parrizas *et al.*, 2011), fundamentados principalmente na capacidade antioxidante do exercício no tecido cerebral (Dishman, Berthoud *et al.*, 2006;

Aguiar e Pinho, 2010). Os neurônios são células extremamente ativas que requerem uma produção constante de energia para realizar suas funções altamente especializadas. Neste sentido, as mitocôndrias são vitais para a manutenção da homeostase e integridade neuronal, sendo que o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial no SNC estão fortemente implicados a processos de envelhecimento e neurodegeneração (Dawson e Dawson, 2003; Thal, Del Tredici *et al.*, 2004). Recentemente, Lau *et al.*, (2011) observaram que o estado III respiratório²⁷ foi preservado no estriado de camundongos exercitados após lesão moderada com MPTP sistêmico, seguido de menor prejuízo à produção de ATP. Os resultados atuais aumentam a informação disponível a este respeito, demonstrando um aumento da atividade do complexo I mitocondrial no SNC após o exercício físico, seguido por uma provável biogênese mitocondrial. Hipoteticamente, este resultado poderia intervir como um dos possíveis mecanismos neuroprotetores do exercício em modelos experimentais de disfunções mitocondriais (ex.: o Parkinsonismo), pois como visto na Introdução, a inibição do complexo I mitocondrial é um marcador patológico da DP. Gereck *et al.*, (2010) já haviam observado que o exercício aumentava a expressão de proteínas deste complexo mitocondrial. De modo pioneiro, os resultados atuais demonstram que o exercício pode prevenir a inibição *ex vivo* do complexo I de mitocôndrias isoladas e tratadas com inibidores deste complexo, como MPP⁺ e a rotenona, que agem no mesmo sítio de ligação do complexo NADH desidrogenase (ou complexo I) na membrana mitocondrial interna (Krueger, Singer *et al.*, 1990; Ward, 2003). O exercício teve sucesso em reduzir pela metade a inibição da atividade do complexo I causada pela concentração intermediária de MPP⁺ (0,5 mM). Entretanto, quando esta inibição atingiu níveis críticos, 80,3 ± 2,3% com a rotenona (5 μM) e 76 ± 2,1% com o MPP⁺ (2,5 mM), o exercício reduziu de maneira modesta (mas ainda significativa) os efeitos da rotenona (15,1±2,5%), mas não do MPP⁺ (0,7±0,4%). A produção de radicais livres, principalmente EROs, aumenta exponencialmente quando os complexos I e III são inibidos (Turrens e Boveris, 1980; Turrens, 1997). Em altas concentrações, as EROs e os radicais derivados são danosos aos organismos vivos e danificam os principais constituintes celulares (Droge, 2002). Por esta razão, a inibição do complexo

²⁷ A cadeia transportadora de elétrons (I-IV) da crista mitocondrial usa substratos da glicólise (NADH) e ciclo de Krebs (FADH₂) para formar um potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), essencial para a fosforilação oxidativa no complexo V. Experimentalmente, a fosforilação oxidativa é estimulada ao máximo com a adição de ADP, conhecida como estado III respiratório. Nos estados II (adição de substratos, formação do $\Delta\Psi_m$) e IV (esgotamento de ADP, ATP máximo), a respiração é mínima.

I é extremamente perigosa, pois as EROs formadas são liberadas diretamente dentro da matriz mitocondrial (Chen, Vazquez *et al.*, 2003). Trabalhos prévios do nosso grupo observaram inibição do complexo I mitocondrial no bulbo olfatório e córtex pré-frontal de camundongos e ratos tratados intranasalmente com MPTP (Moreira, Rial *et al.*, 2010; Prediger, Aguiar *et al.*, 2011). Isto ocorreu após 6 h do tratamento intranasal em ratos, mesmo período relacionado ao pico de estresse oxidativo observado em diferentes estruturas encefálicas após o tratamento intranasal com MPTP (Franco, Prediger *et al.*, 2007).

Neste mesmo sentido, no presente trabalho foi observado um aumento pronunciado na produção de H_2O_2 no estriado dos animais sedentários 6 h após o tratamento intranasal com MPTP. Como descrito acima, este tempo provavelmente representa o pico de estresse oxidativo após o tratamento intranasal com MPTP (Franco, Prediger *et al.*, 2007; Moreira, Rial *et al.*, 2010; Prediger, Aguiar *et al.*, 2011). O estresse oxidativo estriatal induzido pelo MPTP intranasal foi associado a uma marcada diminuição na temperatura corporal dos animais tratados. Portanto, o tratamento intranasal com MPTP induz disfunção mitocondrial e estresse oxidativo acompanhado pela típica resposta aguda e reversível de hipotermia observada anteriormente após a administração sistêmica desta toxina (Freyaldenhoven, Ali *et al.*, 1995; Moy, Albers *et al.*, 1998). De maneira interessante, estas respostas de hipotermia induzida pelo tratamento intranasal com MPTP foram potencializadas nos animais exercitados. O papel da hipotermia em situações de neurotoxicidade ainda não está claro, mas algumas evidências demonstram que a diminuição da temperatura corporal pode ser protetora em vários modelos de lesão neuronal, inclusive no estriado, principalmente em situações de isquemia-reperfusão com excitotoxicidade glutamatérgica (Moy, Albers *et al.*, 1998; Tymianski, Sattler *et al.*, 1998; Yu, Zhou *et al.*, 2011). Os resultados do presente estudo mostraram também que a temperatura corporal variou conjuntamente à produção de H_2O_2 a ao consumo de GSH no estriado, após 6 h do tratamento intranasal com MPTP. Como esperado, o tratamento MPTP consumiu GSH, e os animais exercitados apresentaram maior defesa antioxidante e menor produção de peróxidos. Os efeitos antioxidantes do exercício no SNC começaram a ser descritos na última década (Liu, Yeo *et al.*, 2000; Mattson, 2000). Recentemente, Lau *et al.*, (2011) observaram menores danos oxidativos no estriado de camundongos exercitados após tratamento i.p. com MPTP. Isto reforça o provável papel antioxidante do exercício no estriado, embora existam ainda poucos trabalhos investigando este fenômeno (Somani e Husain, 1997; Aguiar, Tuon *et al.*, 2008; Teixeira, Muller *et al.*, 2011). O resultados do trabalho atual demonstram ainda um aumento da

atividade da enzima GPx no estriado de animais exercitados tratados com MPTP.

A “limpeza” de EROs e peróxidos do estriado e a hipotermia representam respostas promissoras do exercício como um agente antiparkinsoniano. Entretanto, apesar da menor disfunção mitocondrial induzida pelo MPTP (*in vivo*), e pelo MPP⁺ e rotenona (*ex vivo*) observada nos animais exercitados, os resultados atuais demonstram que estas modificações induzidas pelo exercício não foram suficientes para promover neuroproteção frente ao tratamento intranasal com MPTP, uma vez que a redução do conteúdo estriatal de TH e DA não foram modificadas pelo exercício físico. Alguns fatores metodológicos podem estar associados a estes achados. Por exemplo, a interrupção do exercício durante as três semanas que separaram a administração intranasal de MPTP e a avaliação das alterações estriatais (ver Figura 11, página 32) pode ter sido responsável pela ausência de efeitos neuroprotetores.

Uma outra possibilidade para explicar os benefícios funcionais do exercício na ausência de neuroproteção seria a indução de neuroplasticidade dos neurônios remanescentes, bem como de outros componentes da circuitaria cortical ↔ núcleos da base. Os resultados atuais demonstram que o exercício preveniu o desenvolvimento dos prejuízos cognitivos (memórias operacional e implícita) induzidos pelo MPTP, apesar de não prevenir a depleção estriatal de DA após o tratamento com esta toxina ($\downarrow 79,4 \pm 1,6\%$ nos sedentários e $\downarrow 81,9 \pm 1,7\%$ nos exercitados). Alguns trabalhos sugerem que lesões superiores a 60% dos neurônios dopaminérgicos estriatais sejam praticamente impossíveis de sofrerem reversão (Finkelstein, Stanic *et al.*, 2000). Neste sentido, Lau *et al.*, (2011) demonstraram resultados promissores quanto à capacidade do exercício em restaurar parcialmente uma degeneração de $\approx 50\%$ da via nigro-estriatal induzida pelo tratamento sistêmico com MPTP em camundongos. Assim, pode ser especulado que, caso aconteçam, os benefícios do exercício sobre os sintomas motores e não motores em estágios mais avançados da DP provavelmente ocorrerão via plasticidade sináptica da via dopaminérgica nigro-estriatal, assim como de outros neurotransmissores envolvidos, como o Glu.

Neste sentido, Petzinger *et al.*, (2007) demonstraram que o exercício é capaz de restaurar os prejuízos motores induzidos pelo MPTP, sem todavia modificar os danos estriatais, mas diminuindo o *turnover* dopaminérgico estriatal de camundongos tratados sistemicamente com MPTP. Os resultados atuais demonstram que o MPTP aumentou o *turnover* dopaminérgico estriatal, como demonstrado previamente por outros autores em modelos genéticos (Sossi, De La Fuente-Fernandez *et al.*, 2010; Akundi,

Huang *et al.*, 2011; Anwar, Peters *et al.*, 2011) e ambientais (Schneider, 1990; Sundstrom, Fredriksson *et al.*, 1990; Mu, He *et al.*, 2011) da DP. Entretanto, os presentes dados demonstram um efeito *per se* do exercício na diminuição do *turnover* dopaminérgico estriatal, sendo este mantido nos animais tratados com MPTP. De acordo com os resultados do presente estudo, relatos prévios da literatura demonstram que a diminuição do *turnover* dopaminérgico parece não afetar a neurotoxicidade do MPTP (Stenstrom, Sundstrom *et al.*, 1989; Muralikrishnan, Samantaray *et al.*, 2003). A DA é metabolizada em HVA e em DOPAC pelas enzimas MAO-B (Heikkila, Manzino *et al.*, 1984; Langston, Irwin *et al.*, 1984) e COMT (Sundberg, Scheinin *et al.*, 1993; Lyytinen, Kaakkola *et al.*, 2002), e em neuromelanina através de auto-oxidação (Fahn e Cohen, 1992; Shen e Dryhurst, 1996), com a produção de EROs. A diminuição do *turnover* dopaminérgico constitui uma das estratégias neuroprotetoras mais promissoras para a DP, podendo ser obtida através do uso de inibidores da MAO-B (Heikkila, Manzino *et al.*, 1984; Langston, Irwin *et al.*, 1984; Chrisp, Mammen *et al.*, 1991) e da COMT (Sundberg, Scheinin *et al.*, 1993; Lyytinen, Kaakkola *et al.*, 2002; Schrag, 2005). Além disso, alguns trabalhos demonstraram que benefícios motores foram acompanhados do aumento da liberação vesicular de DA no estriado de animais exercitados tratados com MPTP, e menor taxa de depleção de DA no estriado dorsal (Petzinger, Walsh *et al.*, 2007). Em conjunto aos dados da literatura, os resultados atuais sugerem uma maior eficiência sináptica da neurotransmissão dopaminérgica nos animais exercitados, indicada pela maior disponibilidade de DA somado à menor reciclagem deste neurotransmissor. No estriado, estes ajustes da deficiência sináptica de DA desempenham um papel importante para manutenção e normalização da plasticidade sináptica estriatal, como a potenciação ou depressão de longa duração (LTP e a LTD) (Calabresi, Maj, Pisani *et al.*, 1992; Smith, Musleh *et al.*, 2001; Akopian e Walsh, 2007).

Além disso, o papel do exercício na auto-oxidação da DA não pode ser descartado, sendo que os resultados atuais mostram um claro efeito antioxidante do exercício frente ao tratamento intranasal com MPTP. Por outro lado, no modelo da administração intra-estriatal de 6-OHDA verificou-se um efeito neuroprotetor do exercício. A 6-OHDA difere da DA pela velocidade de auto-oxidação 200 vezes maior e conseqüente formação de radicais livres e semiquinonas (Soto-Otero, Mendez-Alvarez *et al.*, 2000). Portanto, o controle desta oxidação pode representar um dos mecanismos de neuroproteção (Soto-Otero, Mendez-Alvarez *et al.*, 2002). Assim, o aumento das defesas antioxidantes no estriado representa um forte candidato para os benefícios comportamentais do exercício em modelos experimentais de Parkinsonismo.

Outra linha de investigação deste trabalho foi a modulação das respostas dos receptores dopaminérgicos frente ao exercício físico seguido do tratamento com 6-OHDA e MPTP. Após longa exposição a antagonistas dopaminérgicos ou lesão de neurônios dopaminérgicos na *SNpc*, os receptores D₂ para DA da via nigro-estriatal exibem alterações adaptativas, como o aumento da densidade e/ou do número de sítios de ligação (Doudet, Holden *et al.*, 2000; Chefer, Kimes *et al.*, 2008). Paradoxalmente, o exercício físico apresenta efeito similar no estriado (Gilliam, Spirduso *et al.*, 1984; Macrae, Spirduso *et al.*, 1987). Na neurodegeneração, estas modificações estão diretamente associadas a super-sensibilidade comportamental à agonistas ou antagonistas dopaminérgicos. Em modelos assimétricos, como a lesão unilateral da via nigro-estriatal, desafios farmacológicos causam um típico comportamento rotacional, como ao desafio com agonistas dopaminérgicos (ex.: R(-)-apomorfina) ou D-anfetamina. Este comportamento rotacional apresenta duas características fundamentais: 1) assimetria, de orientação contralateral ao lado lesionado para agonistas, e 2) frequência diretamente dependente da intensidade da lesão (Alexander, Crutcher *et al.*, 1990). Em modelos simétricos de Parkinsonismo induzidos através do tratamento sistêmico com neurotoxinas (Spooren, Vassout *et al.*, 1998; Shiozaki, Ichikawa *et al.*, 1999; Mihara, Mihara *et al.*, 2007; Pothakos, Kurz *et al.*, 2009), ou em modelos genéticos (Abeliovich, Schmitz *et al.*, 2000; Itier, Ibanez *et al.*, 2003), os animais são desafiados com fármacos dopaminérgicos para avaliação de modificações na quantidade e intensidade de movimentos estereotipados, comportamento de escalada, posturas ou locomoção, que também dependem da intensidade da lesão da via nigro-estriatal.

Os resultados obtidos no desafio com R(-)-apomorfina (0,6 mg/kg. s.c.) sugerem que a 6-OHDA induziu um estado de hemiparkinsonismo nos animais, que não evoluiu nos camundongos exercitados. Após três e quatro semanas da lesão com 6-OHDA, foi observada uma evolução do Parkinsonismo seletivamente no grupo sedentário. Isto ocorreu de modo simultâneo a menor assimetria na tarefa do cilindro, e maior coordenação motora na tarefa do rota-rod em animais exercitados. Todos esses benefícios motores do exercício físico foram acompanhados de neuroproteção, indicado pela maior quantidade de corpos celulares e terminais nervosos marcados positivamente para TH na *SNpc* e estriado, respectivamente. Estas evidências neuroprotetoras do exercício no hemiparkinsonismo induzido pela 6-OHDA são pioneiras, e ainda reforçam a hipótese de que esta propriedade do exercício depende de características metodológicas como a neurotoxina utilizada, pois a linhagem de camundongos foi a mesma utilizada nos experimentos com MPTP, assim como o programa de exercício na esteira também foi a mesmo, e com níveis

semelhantes de lesão dopaminérgica [\downarrow TH estriado (% controle); 6-OHDA: sed = $50 \pm 1,7\%$, exe = $5 \pm 4,5\%$; MPTP: sed = $63,1 \pm 6,6\%$, exe = $66,8 \pm 7,3\%$].

No tratamento sistêmico com MPTP, a super-sensibilidade farmacológica (Shiozaki, Ichikawa *et al.*, 1999; Mihara, Mihara *et al.*, 2007) foi avaliada em comportamentos e posturas estereotipadas. Os resultados demonstraram que os animais exercitados, apesar de apresentarem o mesmo nível de neurodegeneração dopaminérgica que os controles sedentários, apresentaram menor sensibilidade aos fármacos dopaminérgicos. Uma vez que o efeito neuroprotetor do exercício permanece controverso, os benefícios comportamentais observados com o exercício foram provavelmente causados pela diferente sensibilização ou densidade de receptores dopaminérgicos após a indução do Parkinsonismo experimental. Os animais sedentários tratados com MPTP apresentaram maior comportamento de escalada induzido pela R(-)-apomorfina (0,2 mg/kg), assim como maior frequência de posturas catalépticas após o tratamento com haloperidol (0,32 mg/kg), inclusive com maior severidade de catalepsia, e apresentaram um aumento na locomoção após a administração de uma dose subefetiva de (-)-quinpirole (10 μ g/kg). Com a exceção do comportamento de escalada à R(-)-apomorfina, o exercício preveniu todos estes comportamentos associados a super-sensibilidade de receptores D₂ para DA.

À exceção da R(-)-apomorfina, um agonista não-seletivo dos receptores D₁ e D₂ para DA, o haloperidol e (-)-quinpirole têm alta seletividade para os receptores D₂. Entretanto, o haloperidol age somente na isoforma mais longa deste receptor, o D₂(long) ou D₂L²⁸, exclusivamente pós-sináptico. E a depleção gênica da forma D₂L inibe os comportamentos estereotipados induzidos por fármacos dopaminérgicos (Fetsko, Xu *et al.*, 2003), a exemplo do observado nos animais exercitados. Os resultados atuais revelam a importância da plasticidade dos receptores D₂ para DA, provavelmente pós-sinápticos, à experiência com exercício físico. Estes achados refletem a mesma realidade do tratamento clínico atual para a DP, geralmente focados na ativação dos receptor D₂ para DA (Lieberman, Gopinathan *et al.*, 1983; Archer, Palomo *et al.*, 2003). Desde a década de 70, agonistas dopaminérgicos para os receptores D₂ para DA são usados amplamente na DP (Lieberman, Gopinathan *et al.*, 1983; Seeman e Vantol, 1994), pois causam uma melhora motora significativa, provavelmente

²⁸ A variante D₂L (Acesso GenBank NP_000786) apresenta 29 aminoácidos extras na região ICL3⁹⁰ da 3ª alça intracelular. Além disso, a isoforma D₂L predomina no cérebro de camundongos selvagens (90%) (Neve, Neve *et al.*, 1991; Wang, Xu *et al.*, 2000).

devido ao aumento da sensibilidade destes receptores associado ao processo neurodegenerativo (Lahoste, Yu *et al.*, 1993; Marshall, Cole *et al.*, 1993). De modo semelhante, os animais sedentários tratados com (-)-quinpirole apresentaram aumento de locomoção, que não foi observada nos animais exercitados. Enquanto o haloperidol, conhecido por induzir um estado de Parkinsonismo farmacológico em pacientes psiquiátricos (Corsini, Del Zompo *et al.*, 1978; Moleman, Janzen *et al.*, 1986), apresentou grande efeito cataléptico nos animais sedentários tratados com MPTP, novamente os animais exercitados não apresentaram este efeito. Quando avaliado a quantidade de receptores D₂ para DA no estriado dos animais, foi detectado que o MPTP aumentou a densidade destes receptores, anteriormente descrito na literatura como um típico mecanismo compensatório ainda em fases precoces da DP (Bezard, Gross *et al.*, 2003). Entretanto, este aumento foi aproximadamente duas vezes maior nos animais exercitados que nos sedentários, sugerindo um aumento das respostas pré-clínicas de compensação induzido pelo exercício físico. Vários trabalhos anteriores demonstraram que o exercício aumenta a expressão dos receptores D₂ para DA no estriado de animais naïve (isto é, não-lesionados) (Gilliam, Spirduso *et al.*, 1984; Macrae, Spirduso *et al.*, 1987; Foley, Greenwood *et al.*, 2006; Foley e Fleshner, 2008) e tratados sistemicamente com MPTP (Fisher, Petzinger *et al.*, 2004; Vucckovic, Li *et al.*, 2010), com claro impacto na plasticidade sináptica nestes animais, e melhora dos prejuízos motores induzidos pelo MPTP.

Os resultados atuais demonstram que o exercício potencializa adaptações sinápticas pela maior possibilidade de ativação de receptores D₂ para DA nos animais exercitados devido à maior densidade estriatal, e a diminuição do *turnover* dopaminérgico no estriado. Estudos eletrofisiológicos demonstraram que as características farmacológicas e fisiológicas da excitabilidade cortico-estriatal não são afetadas pela neurodegeneração, mas as respostas de LTP e LTD desaparecem (Calabresi, Maj, Mercuri *et al.*, 1992; Calabresi, Maj, Pisani *et al.*, 1992). A ausência de LTD no estriado de roedores denervados pode ser atribuído à insuficiente ativação de receptores dopaminérgicos nestas formas de plasticidade sináptica, que pode ser restaurada pela aplicação de DA exógena (Centonze, Picconi *et al.*, 2001). Quanto à LTP, a ausência desta após denervação dopaminérgica crônica não é apenas causada pela depleção estriatal de DA (Centonze, Picconi *et al.*, 2001), pois o estímulo farmacológico de receptores receptores D₁ e/ou D₂ para DA neste caso são ineficazes. No estriado, estudos morfológicos demonstraram importantes mudanças estruturais após neurodegeneração com impacto à LTP, em particular, a redução do número, forma e tamanho das espinhas dendríticas. Em outras áreas cerebrais, foi demonstrado que as alterações de plasticidade sináptica de longo prazo

associadas à neuroplasticidade funcional ocorrem justamente nas espinhas dendríticas (Smith, Villalba *et al.*, 2009; Villalba, Lee *et al.*, 2009). Atualmente, a perda desta espinhas dendríticas é reconhecida como uma característica patológica chave do Parkinsonismo (Villalba, Lee *et al.*, 2009). O tratamento sistêmico com MPTP reduz estas espinhas dendríticas estriatais, enquanto as remanescentes tornam-se muito excitadas (Vanleeuwen, Petzinger *et al.*, 2010), como sugerem os resultados atuais obtidos com os desafios farmacológicos nos animais tratados com MPTP intranasal. A morfologia dendrítica depende da sinalização de fatores neurotróficos, algo sabidamente influenciado pela experiência com exercício nos animais (Cotman e Berchtold, 2002; Gomez-Pinilla, Ying *et al.*, 2002; Marais, Stein *et al.*, 2009), inclusive no estriado (Aguiar, Speck *et al.*, 2008; Lau, Patki *et al.*, 2011). Deste modo, os resultados atuais e a literatura parecem convergir no aumento da plasticidade sináptica estriatal de animais exercitados quando expostos a modelos de Parkinsonismo.

Uma outra forma de neuroplasticidade é observada após o tratamento crônico com L-DOPA: as discinesias motoras, caracterizadas por uma forma aberrante de plasticidade sináptica somada à degeneração da via dopaminérgica nigro-estriatal. Uma vez desenvolvidas, estas discinesias são muito difíceis de desaparecerem, mesmo com a interrupção do tratamento com a L-DOPA ou a introdução de outros agentes dopaminérgicos (Cenci, 2007). Apesar de conhecidos há quase 50 anos, os mecanismos das discinesias induzidas pela L-DOPA ainda não estão totalmente esclarecidos. Algumas evidências sugerem uma incapacidade do estriado de animais discinéticos na reversão das respostas estriatais de LTP, acompanhada por alta fosforilação do sítio Thr34 da proteína DARPP-32 (Picconi, Centonze *et al.*, 2003). Outras alterações estriatais que tem sido implicadas no desenvolvimento das discinesias são o aumento de expressão do gene cFos (Andersson, Hilbertson *et al.*, 1999) e da liberação de DA por neurônios serotoninérgicos (Carta, Carlsson *et al.*, 2007).

Este trabalho teve sucesso na indução de discinesias pelo tratamento durante duas semanas consecutivas com L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos. Ao mesmo tempo, foi possível observar que os animais discinéticos apresentavam algumas alterações estriatais previamente descritas na literatura, como aumento da liberação de glutamato, da fosforilação da DARPP-32 e dos níveis de cFos (Andersson, Hilbertson *et al.*, 1999; Santini, Valjent *et al.*, 2007; Calabresi, Di Filippo *et al.*, 2010). Novas estratégias anti-discinéticas têm sido propostas nos últimos anos com boas respostas pré-clínica, e alguns composto se encontram na fase de avaliação clínica, como os antagonistas A_{2A} adenosinérgicos, agonistas 5-HT_{1a} serotoninérgicos, antagonistas mGlu5 e NMDA

glutamatergicos, e antagonistas α_2 adrenérgicos (Buck e Ferger, 2010; Calabresi, Di Filippo *et al.*, 2010). Clinicamente, o único fármaco anti-discinético disponível é a amantadina, um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, entretanto o seu uso é limitado pelo grande número de efeitos adversos (ex: confusão mental e alucinações) (Luginger, Wenning *et al.*, 2000). Os resultados desta tese demonstram pela primeira vez as propriedades anti-discinéticas do exercício. Além disso, o exercício também diminuiu as anormalidades da neurotransmissão glutamatérgica e sinalização intracelular induzidas pelo tratamento crônico com L-DOPA. As propriedades do exercício na diminuição da excitabilidade córtico-estriatal já eram conhecidas para o Parkinsonismo (Petzinger, Fisher *et al.*, 2010; Vanleeuwen, Petzinger *et al.*, 2010), mas não para animais discinéticos após tratamento com L-DOPA.

Recentemente, Guan *et al.*, (2010) observaram um aumento das discinesias induzida pela L-DOPA após tentativa de inibir o excesso de fosforilação da proteína DARPP-32 através da inibição da proteína cdk5 em camundongos. Neste trabalho, o exercício diminuiu o conteúdo estriatal de cdk5 nos animais que apresentaram menores níveis de discinesia (neste caso, exercitados), um resultado contrastante com o de Guan *et al.*, (2010). Uma possível explicação para estas diferenças é que como o exercício foi iniciado simultaneamente ao tratamento com L-DOPA, pode-se especular que o exercício preveniu parcialmente o desenvolvimento das discinesias, ao contrário de reverter as discinesias. Este resultado é promissor, pois como discutido anteriormente, a abordagem clínica das discinesias quando já instaladas é de difícil controle.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho demonstram o potencial do exercício físico como um agente modificador da DP e das discinesias induzidas por L-DOPA. Estas modificações contemplam objetivos modernos para a abordagem da doença, como o alívio dos sintomas cognitivos, ainda um desafio à terapia farmacológica ou cirúrgica. Entretanto, a neuroproteção permanece controversa, embora os resultados sugiram que o exercício possa retardar a evolução sintomática do Parkinsonismo, mais um objetivo moderno para novos agentes antiparkinsonianos. Ademais, o exercício promoveu um aumento na plasticidade estriatal em animais submetidos aos modelos da administração intra-estriatal de 6-OHDA e intranasal de MPTP, o que parece contribuir para os efeitos anti-discinéticos desta intervenção ambiental ao tratamento crônico com L-DOPA.

6. REFERÊNCIAS

- ABELIOVICH, A.; SCHMITZ, Y.; FARINAS, I.; CHOI-LUNDBERG, D.; HO, W. H.; CASTILLO, P. E.; SHINSKY, N.; VERDUGO, J. M.; ARMANINI, M.; RYAN, A.; HYNES, M.; PHILLIPS, H.; SULZER, D.; ROSENTHAL, A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. **Neuron** 2000, 25, 239-52.
- AGUIAR, A. S., JR.; ARAUJO, A. L.; DA-CUNHA, T. R.; SPECK, A. E.; IGNACIO, Z. M.; DE-MELLO, N.; PREDIGER, R. D. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Res Bull** 2009, 79, 452-7.
- AGUIAR, A. S., JR.; BOEMER, G.; RIAL, D.; CORDOVA, F. M.; MANCINI, G.; WALZ, R.; DE BEM, A. F.; LATINI, A.; LEAL, R. B.; PINHO, R. A.; PREDIGER, R. D. High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. **Neuroscience** 2010, 171, 1216-27.
- AGUIAR, A. S., JR.; PINHO, R. A. **The Brain Redox Paradox of Physical Exercise**. In: KOZYREV, D. e SLUTSKY, V. (Ed.). Handbook of Free Radicals: Formation, Types and Effects. New York: Nova Science Publishers, 2010, 153-166.
- AGUIAR, A. S., JR.; PREDIGER, R. D. **Brain in Movement: The Role of Physical Exercise in Parkinson's Disease**. In: LIEBERMAN, D. C. (Ed.). Aerobic Exercise and Athletic Performance: Types, Duration and Health Benefits. New York: Nova Science Publishers, 2010, 85-120.
- AGUIAR, A. S., JR.; SPECK, A. E.; PREDIGER, R. D.; KAPCZINSKI, F.; PINHO, R. A. Downhill training upregulates mice hippocampal and striatal brain-derived neurotrophic factor levels. **J Neural Transm** 2008, 115, 1251-5.
- AGUIAR, A. S., JR.; TUON, T.; ALBUQUERQUE, M. M.; ROCHA, G. S.; SPECK, A. E.; ARAUJO, J. C.; DAFRE, A. L.; PREDIGER, R. D.; PINHO, R. A. The exercise redox paradigm in the Down's syndrome: improvements in motor function and increases in blood oxidative status in young adults. **J Neural Transm** 2008, 115, 1643-50.
- AGUIAR, A. S., JR.; TUON, T.; PINHO, C. A.; SILVA, L. A.; ANDREAZZA, A. C.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; STRECK, E. L.; PINHO, R. A. Intense exercise induces mitochondrial dysfunction in mice brain. **Neurochem Res** 2008, 33, 51-8.
- AGUIAR, A. S., JR.; TUON, T.; SOARES, F. S.; DA ROCHA, L. G.; SILVEIRA, P. C.; PINHO, R. A. The effect of n-acetylcysteine and deferoxamine on exercise-

induced oxidative damage in striatum and hippocampus of mice. **Neurochem Res** 2008, 33, 729-36.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol** 1981, 77, 373-82.

AKOPIAN, G.; WALSH, J. P. Reliable long-lasting depression interacts with variable short-term facilitation to determine corticostriatal paired-pulse plasticity in young rats. **J Physiol** 2007, 580, 225-40.

AKUNDI, R. S.; HUANG, Z.; EASON, J.; PANDYA, J. D.; ZHI, L.; CASS, W. A.; SULLIVAN, P. G.; BUELER, H. Increased mitochondrial calcium sensitivity and abnormal expression of innate immunity genes precede dopaminergic defects in Pink1-deficient mice. **PLoS One** 2011, 6, e16038.

AL-JARRAH, M.; JAMOUS, M.; AL ZAILAEY, K.; BWEIR, S. O. Endurance exercise training promotes angiogenesis in the brain of chronic/progressive mouse model of Parkinson's Disease. **NeuroRehabilitation** 2010, 26, 369-73.

AL-JARRAH, M.; POTHAKOS, K.; NOVIKOVA, L.; SMIRNOVA, I. V.; KURZ, M. J.; STEHNO-BITTEL, L.; LAU, Y. S. Endurance exercise promotes cardiorespiratory rehabilitation without neurorestoration in the chronic mouse model of parkinsonism with severe neurodegeneration. **Neuroscience** 2007, 149, 28-37.

ALEXANDER, G. E.; CRUTCHER, M. D.; DELONG, M. R. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. **Prog Brain Res** 1990, 85, 119-46.

ALLEN, D. L.; HARRISON, B. C.; MAASS, A.; BELL, M. L.; BYRNES, W. C.; LEINWAND, L. A. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. **J Appl Physiol** 2001, 90, 1900-8.

American College of Sports Medicine Position Stand. The recommended quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory and muscular fitness, and flexibility in healthy adults. **Med Sci Sports Exerc** 1998, 30, 975-91.

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. **Neurobiol Dis** 1999, 6, 461-74.

ANWAR, S.; PETERS, O.; MILLERSHIP, S.; NINKINA, N.; DOIG, N.; CONNOR-ROBSON, N.; THRELFELL, S.; KOONER, G.; DEACON, R. M.;

BANNERMAN, D. M.; BOLAM, J. P.; CHANDRA, S. S.; CRAGG, S. J.; WADE-MARTINS, R.; BUCHMAN, V. L. Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. **J Neurosci** 2011, 31, 7264-74.

ARCHER, T.; PALOMO, T.; MCARTHUR, R.; FREDRIKSSON, A. Effects of acute administration of DA agonists on locomotor activity: MPTP versus neonatal intracerebroventricular 6-OHDA treatment. **Neurotox Res** 2003, 5, 95-110.

ARCOS, J. C.; SOHAL, R. S.; SUN, S. C.; ARGUS, M. F.; BURCH, G. E. Changes in ultrastructure and respiratory control in mitochondria of rat heart hypertrophied by exercise. **Exp Mol Pathol** 1968, 8, 49-65.

ASTRAND, I. Aerobic work capacity in men and women with special reference to age. **Acta Physiol Scand Suppl** 1960, 49, 1-92.

BAI, F.; WITZMANN, F. A. Synaptosome proteomics. **Subcell Biochem** 2007, 43, 77-98.

BARBEAU, A. Preliminary observations on abnormal catecholamine metabolism in basal ganglia diseases. **Neurology** 1960, 10, 446-51.

BARBEAU, A. The pathogenesis of Parkinson's disease: a new hypothesis. **Can Med Assoc J** 1962, 87, 802-7.

BARBEAU, A. The clinical physiology of side effects in long-term L-DOPA therapy. **Adv Neurol** 1974, 5, 347-365.

BARNARD, R. J.; EDGERTON, V. R.; PETER, J. B. Effect of exercise on skeletal muscle. I. Biochemical and histochemical properties. **J Appl Physiol** 1970, 28, 762-6.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma** 1995, 12, 1-21.

BECKER, G.; MULLER, A.; BRAUNE, S.; BUTTNER, T.; BENECKE, R.; GREULICH, W.; KLEIN, W.; MARK, G.; RIEKE, J.; THUMLER, R. Early diagnosis of Parkinson's disease. **J Neurol** 2002, 249 Suppl 3, III/40-8.

BENNETT, P.; NICHOLL, D. J. Absence of the G209A mutation in the alpha-synuclein gene in British families with Parkinson's disease. **Neurology** 1998, 50, 1183.

BENSADOUN, J. C.; DEGLON, N.; TSENG, J. L.; RIDET, J. L.; ZURN, A. D.; AEBISCHER, P. Lentiviral vectors as a gene delivery system in the mouse

midbrain: cellular and behavioral improvements in a 6-OHDA model of Parkinson's disease using GDNF. **Exp Neurol** 2000, 164, 15-24.

BERLIN, J. A.; COLDITZ, G. A. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. **Am J Epidemiol** 1990, 132, 612-28.

BEZARD, E.; GROSS, C. E.; BROTHIE, J. M. Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. **Trends Neurosci** 2003, 26, 215-21.

BILOWIT, D. S. Establishing physical objectives in the rehabilitation of patients with Parkinson's disease; gymnasium activities. **Phys Ther Rev** 1956, 36, 176-8.

BIRKMAYER, W.; HORNYKIEWICZ, O. The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. **Wien Klin Wochenschr** 1961, 73, 787-8.

BISKUP, S.; GERLACH, M.; KUPSCH, A.; REICHMANN, H.; RIEDERER, P.; VIERGE, P.; WULLNER, U.; GASSER, T. Genes associated with Parkinson syndrome. **J Neurol** 2008, 255 Suppl 5, 8-17.

BLANCHET, P. J.; KONITSIOTIS, S.; CHASE, T. N. Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. **Mov Disord** 1998, 13, 798-802.

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

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol** 2001, 65, 135-72.

BONACCI, J.; CHAPMAN, A.; BLANCH, P.; VICENZINO, B. Neuromuscular adaptations to training, injury and passive interventions: implications for running economy. **Sports Med** 2009, 39, 903-21.

BOULTON, A. A.; JUORIO, A. V.; PHILIPS, S. R.; WU, P. H. The effects of reserpine and 6-hydroxydopamine on the concentrations of some arylalkylamines in rat brain. **Br J Pharmacol** 1977, 59, 209-14.

BOVERIS, A.; NAVARRO, A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. **IUBMB Life** 2008, 60, 308-14.

BOWEN, B. D.; CARMER, M. E. The Effect of a Standard Exercise Upon the Oxygen Consumption of Normal, Overweight, and Chronically Ill Individuals. **J Clin Invest** 1926, 2, 299-313.

- BRAAK, H.; RUB, U.; DEL TREDICI, K. Cognitive decline correlates with neuropathological stage in Parkinson's disease. **J Neurol Sci** 2006, 248, 255-8.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976, 72, 248-54.
- BROTCHIE, J. M. Adjuncts to dopamine replacement: a pragmatic approach to reducing the problem of dyskinesia in Parkinson's disease. **Mov Disord** 1998, 13, 871-6.
- BUCK, K.; FERGER, B. L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a drug discovery perspective. **Drug Discov Today** 2010, 15, 867-75.
- BUDA, O.; ARSENE, D.; CEAUSU, M.; DERMENGIU, D.; CURCA, G. C. Georges Marinesco and the early research in neuropathology. **Neurology** 2009, 72, 88-91.
- BURNS, R. S.; CHIUEH, C. C.; MARKEY, S. P.; EBERT, M. H.; JACOBOWITZ, D. M.; KOPIN, I. J. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1983, 80, 4546-50.
- CALABRESI, P.; DI FILIPPO, M.; GHIGLIERI, V.; TAMBASCO, N.; PICCONI, B. Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap. **Lancet Neurol** 2010, 9, 1106-17.
- CALABRESI, P.; MAJ, R.; MERCURI, N. B.; BERNARDI, G. Coactivation of D1 and D2 dopamine receptors is required for long-term synaptic depression in the striatum. **Neurosci Lett** 1992, 142, 95-9.
- CALABRESI, P.; MAJ, R.; PISANI, A.; MERCURI, N. B.; BERNARDI, G. Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. **J Neurosci** 1992, 12, 4224-33.
- CARDOSO, F.; CAMARGOS, S. T.; SILVA JUNIOR, G. A. Etiology of parkinsonism in a Brazilian movement disorders clinic. **Arq Neuropsiquiatr** 1998, 56, 171-5.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol** 1985, 113, 484-90.
- CARLSSON, A. Detection and assay of dopamine. **Pharmacol Rev** 1959a, 11, 300-4.

CARLSSON, A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. **Pharmacol Rev** 1959b, 11, 490-3.

CARLSSON, A. The "on-off" effect. **Adv Neurol** 1974, 5, 367-8.

CARLSSON, A. A half-century of neurotransmitter research: impact on neurology and psychiatry. Nobel lecture. **Biosci Rep** 2001, 21, 691-710.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. O. R. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. **Nature** 1957, 180, 1200-1200.

CARLSSON, T.; CARTA, M.; WINKLER, C.; BJORKLUND, A.; KIRIK, D. Serotonin neuron transplants exacerbate L-DOPA-induced dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease. **J Neurosci** 2007, 27, 8011-22.

CARTA, M.; CARLSSON, T.; KIRIK, D.; BJORKLUND, A. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. **Brain** 2007, 130, 1819-33.

CARTER, J. H.; NUTT, J. G.; WOODWARD, W. R. The effect of exercise on levodopa absorption. **Neurology** 1992, 42, 2042-5.

CARVEY, P. M.; PUNATI, A.; NEWMAN, M. B. Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. **Cell Transplant** 2006, 15, 239-50.

CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch Biochem Biophys** 1996, 328, 309-16.

CATHCART, R.; SCHWIERS, E.; AMES, B. N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. **Anal Biochem** 1983, 134, 111-6.

CENCI, M. A. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. **Trends Neurosci** 2007, 30, 236-43.

CENTONZE, D.; PICCONI, B.; GUBELLINI, P.; BERNARDI, G.; CALABRESI, P. Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. **Eur J Neurosci** 2001, 13, 1071-7.

CHADDOCK, L.; ERICKSON, K. I.; PRAKASH, R. S.; VANPATTER, M.; VOSS, M. W.; PONTIFEX, M. B.; RAINE, L. B.; HILLMAN, C. H.; KRAMER, A. F. Basal ganglia volume is associated with aerobic fitness in preadolescent children. **Dev Neurosci** 2010, 32, 249-56.

CHAN, P.; JIANG, X.; FORNO, L. S.; DI MONTE, D. A.; TANNER, C. M.; LANGSTON, J. W. Absence of mutations in the coding region of the alpha-synuclein gene in pathologically proven Parkinson's disease. **Neurology** 1998, 50, 1136-7.

CHAUDHURI, K. R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol** 2006, 5, 235-45.

CHEFER, S. I.; KIMES, A. S.; MATOCHIK, J. A.; HORTI, A. G.; KURIAN, V.; SHUMWAY, D.; DOMINO, E. F.; LONDON, E. D.; MUKHIN, A. G. Estimation of D2-like receptor occupancy by dopamine in the putamen of hemiparkinsonian Monkeys. **Neuropsychopharmacology** 2008, 33, 270-8.

CHEN, H.; ZHANG, S. M.; SCHWARZSCHILD, M. A.; HERNAN, M. A.; ASCHERIO, A. Physical activity and the risk of Parkinson disease. **Neurology** 2005, 64, 664-9.

CHEN, Q.; VAZQUEZ, E. J.; MOGHADDAS, S.; HOPPEL, C. L.; LESNEFSKY, E. J. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. **J Biol Chem** 2003, 278, 36027-31.

CHRISP, P.; MAMMEN, G. J.; SORKIN, E. M. Selegiline. A review of its pharmacology, symptomatic benefits and protective potential in Parkinson's disease. **Drugs Aging** 1991, 1, 228-48.

CLARK, E. C.; CLEMENTS, B. G.; ERICKSON, D. J.; MACCARTY, C. S.; MULDER, D. W. Therapeutic exercises in management of paralysis agitans. **J Am Med Assoc** 1956, 162, 1041-3.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. **Dopamine**. In: COOPER, J. R.; BLOOM, F. E., *et al* (Ed.). *The biochemical basis of Neuropharmacology*. New York: Oxford University Press, 2003, 225-270.

COPYRIGHT COLLECTION (LIBRARY OF CONGRESS). [**Awakenings--trailer**]. United States: Columbia Pictures: 1 reel of 1 (254 ft.) p. 1990.

CORSINI, G. U.; DEL ZOMPO, M.; SPISSU, A.; MANGONI, A.; GESSA, G. L. Parkinsonism by haloperidol and piribedil. **Psychopharmacology (Berl)** 1978, 59, 139-41.

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

COTZIAS, G. C. L-Dopa for Parkinsonism. **N Engl J Med** 1968, 278, 630.

DA CUNHA, C.; ANGELUCCI, M. E.; CANTERAS, N. S.; WONNACOTT, S.; TAKAHASHI, R. N. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. **Cell Mol Neurobiol** 2002, 22, 227-37.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, E. C.; DOMBROWSKI, P.; BORTOLANZA, M.; SANTOS, L. M.; BOSCHEN, S. L.; MIYOSHI, E. Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. **Behav Brain Res** 2009, 199, 157-70.

DAGHER, A.; OWEN, A. M.; BOECKER, H.; BROOKS, D. J. The role of the striatum and hippocampus in planning: a PET activation study in Parkinson's disease. **Brain** 2001, 124, 1020-32.

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

DAVIS, G. C.; WILLIAMS, A. C.; MARKEY, S. P.; EBERT, M. H.; CAINE, E. D.; REICHERT, C. M.; KOPIN, I. J. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. **Psychiatry Res** 1979, 1, 249-54.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science** 2003, 302, 819-22.

DAWSON, T. M.; KO, H. S.; DAWSON, V. L. Genetic animal models of Parkinson's disease. **Neuron** 2010, 66, 646-61.

DE RIJK, M. C.; LAUNER, L. J.; BERGER, K.; BRETELER, M. M.; DARTIGUES, J. F.; BALDERESCHI, M.; FRATIGLIONI, L.; LOBO, A.; MARTINEZ-LAGE, J.; TRENKWALDER, C.; HOFMAN, A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. **Neurology** 2000, 54, S21-3.

DESPLATS, P.; LEE, H. J.; BAE, E. J.; PATRICK, C.; ROCKENSTEIN, E.; CREWS, L.; SPENCER, B.; MASLIAH, E.; LEE, S. J. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009, 106, 13010-5.

DIBBLE, L. E.; HALE, T. F.; MARCUS, R. L.; DROGE, J.; GERBER, J. P.; LASTAYO, P. C. High-intensity resistance training amplifies muscle hypertrophy and functional gains in persons with Parkinson's disease. **Mov Disord** 2006, 21, 1444-52.

DIBBLE, L. E.; HALE, T. F.; MARCUS, R. L.; GERBER, J. P.; LASTAYO, P. C. High intensity eccentric resistance training decreases bradykinesia and improves Quality Of Life in persons with Parkinson's disease: a preliminary study. **Parkinsonism Relat Disord** 2009, 15, 752-7.

DILL, D. B.; CONSOLAZIO, C. F. Responses to exercise as related to age and environmental temperature. **J Appl Physiol** 1962, 17, 645-8.

DING, Y.; RESTREPO, J.; WON, L.; HWANG, D. Y.; KIM, K. S.; KANG, U. J. Chronic 3,4-dihydroxyphenylalanine treatment induces dyskinesia in aphakia mice, a novel genetic model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis** 2007, 27, 11-23.

DISHMAN, R. K.; BERTHOUD, H. R.; BOOTH, F. W.; COTMAN, C. W.; EDGERTON, V. R.; FLESHNER, M. R.; GANDEVIA, S. C.; GOMEZ-PINILLA, F.; GREENWOOD, B. N.; HILLMAN, C. H.; KRAMER, A. F.; LEVIN, B. E.; MORAN, T. H.; RUSSO-NEUSTADT, A. A.; SALAMONE, J. D.; VAN HOOMISSEN, J. D.; WADE, C. E.; YORK, D. A.; ZIGMOND, M. J. Neurobiology of exercise. **Obesity (Silver Spring)** 2006, 14, 345-56.

DLUZEN, D. E.; KEFALAS, G. The effects of intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) upon catecholamine concentrations within olfactory bulbs and corpus striatum of male mice. **Brain Res** 1996, 741, 215-9.

DOHERTY, K. M.; VAN DE WARRENBURG, B. P.; PERALTA, M. C.; SILVEIRA-MORIYAMA, L.; AZULAY, J. P.; GERSHANIK, O. S.; BLOEM, B. R. Postural deformities in Parkinson's disease. **Lancet Neurol** 2011,

DOTY, R. L.; DEEMS, D. A.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. **Neurology** 1988, 38, 1237-44.

DOUDET, D. J.; HOLDEN, J. E.; JIVAN, S.; MCGEER, E.; WYATT, R. J. In vivo PET studies of the dopamine D₂ receptors in rhesus monkeys with long-term MPTP-induced parkinsonism. **Synapse** 2000, 38, 105-13.

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

DUNKLEY, P. R.; JARVIE, P. E.; ROBINSON, P. J. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. **Nat Protoc** 2008, 3, 1718-28.

EAKER, E. Y.; BIXLER, G. B.; DUNN, A. J.; MORESHEAD, W. V.; MATHIAS, J. R. Chronic alterations in jejunal myoelectric activity in rats due to MPTP. **Am J Physiol** 1987, 253, G809-15.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. **Klin Wochenschr** 1960, 38, 1236-9.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys** 1959, 82, 70-7.

FAHN, S.; COHEN, G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. **Ann Neurol** 1992, 32, 804-12.

FAHN, S.; ELTON, R. L. **UPDRS Development Committee. Unified Parkinson's Disease Rating Scale.** In: FAHN, S.; MARSDEN, C. D., *et al* (Ed.). Recent Developments in Parkinson's Disease. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1987, 153-163.

FALLS, W. A.; FOX, J. H.; MACAULAY, C. M. Voluntary exercise improves both learning and consolidation of cued conditioned fear in C57 mice. **Behav Brain Res** 2010, 207, 321-31.

FELICIO, L. F.; FLORIO, J. C.; SIDER, L. H.; CRUZ-CASALLAS, P. E.; BRIDGES, R. S. Reproductive experience increases striatal and hypothalamic dopamine levels in pregnant rats. **Brain Res Bull** 1996, 40, 253-6.

FENELON, G. Psychosis in Parkinson's disease: phenomenology, frequency, risk factors, and current understanding of pathophysiologic mechanisms. **CNS Spectr** 2008, 13, 18-25.

FERREIRA, T. L., MOREIRA, K. M., IKEDA, D. C., BUENO, O. F., OLIVEIRA, M. G. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. **Brain Res** 2003, 987, 17-24.

FERREIRA, T. L., SHAMMAH-LAGNADO, S. J., BUENO, O. F., MOREIRA, K. M., FORNARI, R. V., OLIVEIRA, M. G. The indirect amygdala-dorsal striatum pathway mediates conditioned freezing: insights on emotional memory networks. **Neuroscience** 2008, 153, 84-94.

FETSKO, L. A.; XU, R.; WANG, Y. Alterations in D1/D2 synergism may account for enhanced stereotypy and reduced climbing in mice lacking dopamine D₂L receptor. **Brain Res** 2003, 967, 191-200.

FIGUEIREDO, C. P.; PAMPLONA, F. A.; MAZZUCO, T. L.; AGUIAR, A. S., JR.; WALZ, R.; PREDIGER, R. D. Role of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its receptor in the central nervous system: therapeutic potential in neurological diseases. **Behav Pharmacol** 2010,

FINKELSTEIN, D. I.; STANIC, D.; PARISH, C. L.; TOMAS, D.; DICKSON, K.; HORNE, M. K. Axonal sprouting following lesions of the rat substantia nigra. **Neuroscience** 2000, 97, 99-112.

FISHER, B. E.; PETZINGER, G. M.; NIXON, K.; HOGG, E.; BREMMER, S.; MESHUL, C. K.; JAKOWEC, M. W. Exercise-induced behavioral recovery and neuroplasticity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse basal ganglia. **J Neurosci Res** 2004, 77, 378-90.

FISHER, B. E.; WU, A. D.; SALEM, G. J.; SONG, J.; LIN, C. H.; YIP, J.; CEN, S.; GORDON, J.; JAKOWEC, M.; PETZINGER, G. The effect of exercise training in improving motor performance and corticomotor excitability in people with early Parkinson's disease. **Arch Phys Med Rehabil** 2008, 89, 1221-9.

FOLEY, T. E.; FLESHNER, M. Neuroplasticity of dopamine circuits after exercise: implications for central fatigue. **Neuromolecular Med** 2008, 10, 67-80.

FOLEY, T. E.; GREENWOOD, B. N.; DAY, H. E.; KOCH, L. G.; BRITTON, S. L.; FLESHNER, M. Elevated central monoamine receptor mRNA in rats bred for high endurance capacity: implications for central fatigue. **Behav Brain Res** 2006, 174, 132-42.

FRANCO, J.; PREDIGER, R. D.; PANDOLFO, P.; TAKAHASHI, R. N.; FARINA, M.; DAFRE, A. L. Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb. **Life Sci** 2007, 80, 1906-14.

FREYALDENHOVEN, T. E.; ALI, S. F.; HART, R. W. MPTP- and MPP⁽⁺⁾-induced effects on body temperature exhibit age- and strain-dependence in mice. **Brain Res** 1995, 688, 161-70.

FROST, B.; DIAMOND, M. I. Prion-like mechanisms in neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci** 2010, 11, 155-9.

FUJIMOTO, K. Management of non-motor complications in Parkinson's disease. **J Neurol** 2009, 256 Suppl 3, 299-305.

GELB, D. J.; OLIVER, E.; GILMAN, S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. **Arch Neurol** 1999, 56, 33-9.

GERECKE, K. M.; JIAO, Y.; PANI, A.; PAGALA, V.; SMEYNE, R. J. Exercise protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. **Brain Res** 2010, 1341, 72-83.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J Neural Transm** 1996, 103, 987-1041.

GERMAN, D. C.; MANAYE, K. F. Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. **J Comp Neurol** 1993, 331, 297-309.

GERMAN, D. C.; NELSON, E. L.; LIANG, C. L.; SPECIALE, S. G.; SINTON, C. M.; SONSALLA, P. K. The neurotoxin MPTP causes degeneration of specific

nucleus A8, A9 and A10 dopaminergic neurons in the mouse. **Neurodegeneration** 1996, 5, 299-312.

GILLIAM, P. E.; SPIRDUSO, W. W.; MARTIN, T. P.; WALTERS, T. J.; WILCOX, R. E.; FARRAR, R. P. The effects of exercise training on [³H]-spiperone binding in rat striatum. **Pharmacol Biochem Behav** 1984, 20, 863-7.

GNANALINGHAM, K. K.; EROL, D. D.; HUNTER, A. J.; SMITH, L. A.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Differential anti-parkinsonian effects of benzazepine D₁ dopamine agonists with varying efficacies in the MPTP-treated common marmoset. **Psychopharmacology (Berl)** 1995, 117, 275-86.

GOEDERT, M.; CLAVAGUERA, F.; TOLNAY, M. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. **Trends Neurosci** 2010, 33, 317-25.

GOETZ, C. G. **Charcot and Parkinson's Disease**. In: FACTOR, S. A. e WEINER, W. J. (Ed.). *Parkinson's Disease: Diagnosis and Clinical Management*. New York: Demos Medical Publishing, 2002, 8-10.

GOETZ, C. G.; BONDUELLE, M. Charcot as therapeutic interventionist and treating neurologist. **Neurology** 1995, 45, 2102-6.

GOLDBERG, M. S.; PISANI, A.; HABURCAK, M.; VORTHERMS, T. A.; KITADA, T.; COSTA, C.; TONG, Y.; MARTELLA, G.; TSCHERTER, A.; MARTINS, A.; BERNARDI, G.; ROTH, B. L.; POTHOS, E. N.; CALABRESI, P.; SHEN, J. Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial Parkinsonism-linked gene DJ-1. **Neuron** 2005, 45, 489-96.

GOMEZ-PINILLA, F.; YING, Z.; ROY, R. R.; MOLTENI, R.; EDGERTON, V. R. Voluntary exercise induces a BDNF-mediated mechanism that promotes neuroplasticity. **J Neurophysiol** 2002, 88, 2187-95.

GORELL, J. M.; JOHNSON, C. C.; RYBICKI, B. A.; PETERSON, E. L.; RICHARDSON, R. J. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. **Neurology** 1998, 50, 1346-50.

GORTON, L. M.; VUCKOVIC, M. G.; VERTELKINA, N.; PETZINGER, G. M.; JAKOWEC, M. W.; WOOD, R. I. Exercise effects on motor and affective behavior and catecholamine neurochemistry in the MPTP-lesioned mouse. **Behav Brain Res** 2010, 213, 253-62.

GRILLON, C. Startle reactivity and anxiety disorders: aversive conditioning, context, and neurobiology. **Biol Psychiatry** 2002, 52, 958-75.

GROEDEL. The mechanic - gymnastic and balneo - therapeutic treatment of chronic cardiac disorders. **The Lancet** 1895, 145, 802-804.

GUAN, Q.; LIU, X.; HE, Y.; JIN, L.; ZHAO, L. Effect of cdk5 antagonist on L-dopa-induced dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease. **Int J Neurosci** 2010, 120, 421-7.

GUNN, A. J.; BATTIN, M.; GLUCKMAN, P. D.; GUNN, T. R.; BENNET, L. Therapeutic hypothermia: from lab to NICU. **J Perinat Med** 2005, 33, 340-6.

GUNN, A. J.; THORESEN, M. Hypothermic neuroprotection. **NeuroRx** 2006, 3, 154-69.

GUPTA, M.; GUPTA, B. K.; THOMAS, R.; BRUEMMER, V.; SLADEK, J. R., JR.; FELTEN, D. L. Aged mice are more sensitive to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment than young adults. **Neurosci Lett** 1986, 70, 326-31.

GUTMAN, M.; SINGER, T. P.; CASIDA, J. E. Role of multiple binding sites in the inhibition of NADH oxidase by piericidin and rotenone. **Biochem Biophys Res Commun** 1969, 37, 615-22.

HAGAN, J. J.; MIDDLEMISS, D. N.; SHARPE, P. C.; POSTE, G. H. Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. **Trends Pharmacol Sci** 1997, 18, 156-63.

HAKANSSON, K.; LINDSKOG, M.; POZZI, L.; USIELLO, A.; FISONE, G. DARPP-32 and modulation of cAMP signaling: involvement in motor control and levodopa-induced dyskinesia. **Parkinsonism Relat Disord** 2004, 10, 281-6.

HANSEN, C.; ANGOT, E.; BERGSTROM, A. L.; STEINER, J. A.; PIERI, L.; PAUL, G.; OUTEIRO, T. F.; MELKI, R.; KALLUNKI, P.; FOG, K.; LI, J. Y.; BRUNDIN, P. alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. **J Clin Invest** 2011, 121, 715-25.

HART, J. S.; HEROUX, O. Exercise and temperature regulation in lemmings and rabbits. **Can J Biochem Physiol** 1955, 33, 428-35.

HASKELL, W. L.; LEE, I. M.; PATE, R. R.; POWELL, K. E.; BLAIR, S. N.; FRANKLIN, B. A.; MACERA, C. A.; HEATH, G. W.; THOMPSON, P. D.; BAUMAN, A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Med Sci Sports Exerc** 2007, 39, 1423-34.

- 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. **Neurorehabil Neural Repair** 2007, 21, 107-15.
- HAVEL, R. J.; NAIMARK, A.; BORCHGREVINK, C. F. Turnover rate and oxidation of free fatty acids of blood plasma in man during exercise: studies during continuous infusion of palmitate-1-C¹⁴. **J Clin Invest** 1963, 42, 1054-63.
- HEIKKILA, R. E.; MANZINO, L.; CABBAT, F. S.; DUVOISIN, R. C. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. **Nature** 1984, 311, 467-9.
- HENRY, B.; FOX, S. H.; PEGGS, D.; CROSSMAN, A. R.; BROTHIE, J. M. The alpha2-adrenergic receptor antagonist idazoxan reduces dyskinesia and enhances anti-parkinsonian actions of L-dopa in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. **Mov Disord** 1999, 14, 744-53.
- HERMAN, T.; GILADI, N.; GRUENGLINGER, L.; HAUSDORFF, J. M. Six weeks of intensive treadmill training improves gait and quality of life in patients with Parkinson's disease: a pilot study. **Arch Phys Med Rehabil** 2007, 88, 1154-8.
- HILLE, C. J.; FOX, S. H.; MANEUF, Y. P.; CROSSMAN, A. R.; BROTHIE, J. M. Antiparkinsonian action of a delta opioid agonist in rodent and primate models of Parkinson's disease. **Exp Neurol** 2001, 172, 189-98.
- HIRSCH, M. A.; TOOLE, T.; MAITLAND, C. G.; RIDER, R. A. The effects of balance training and high-intensity resistance training on persons with idiopathic Parkinson's disease. **Arch Phys Med Rehabil** 2003, 84, 1109-17.
- HOEHN, M. M.; YAHR, M. D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. **Neurology** 1967, 17, 427-42.
- HOEHN, M. M.; YAHR, M. D. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. 1967. **Neurology** 2001, 57, S11-26.
- HOLDORFF, B. Fritz Heinrich Lewy (1885-1950). **J Neurol** 2006, 253, 677-8.
- HONG, Z.; WANG, G.; GU, J.; PAN, J.; BAI, L.; ZHANG, S.; CHEN, S. D. Tripchlorolide protects against MPTP-induced neurotoxicity in C57BL/6 mice. **Eur J Neurosci** 2007, 26, 1500-8.
- HORNYKIEWICZ, O. L-DOPA: from a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. **Amino Acids** 2002, 23, 65-70.
- HORVITZ, J. C. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. **Neuroscience** 2000, 96, 651-6.

HOUCHI, H.; BABOVIC, D.; PIERREFICHE, O.; LEDENT, C.; DAOUST, M.; NAASSILA, M. CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D₂ receptors. **Neuropsychopharmacology** 2005, 30, 339-49.

HUGHES, A. J.; DANIEL, S. E.; KILFORD, L.; LEES, A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 1992, 55, 181-4.

IKEDA, H.; BABA, O.; ISHINO, H. L-dopa induced psychosis-dyskinesia complex. **No To Shinkei** 1972, 14, 275-80.

IKEDA, S.; KAWAMOTO, H.; KASAOKA, K.; HITOMI, Y.; KIZAKI, T.; SANKAI, Y.; OHNO, H.; HAGA, S.; TAKEMASA, T. Muscle type-specific response of PGC-1 alpha and oxidative enzymes during voluntary wheel running in mouse skeletal muscle. **Acta Physiol (Oxf)** 2006, 188, 217-23.

ITIER, J. M.; IBANEZ, P.; MENA, M. A.; ABBAS, N.; COHEN-SALMON, C.; BOHME, G. A.; LAVILLE, M.; PRATT, J.; CORTI, O.; PRADIER, L.; RET, G.; JOUBERT, C.; PERIQUET, M.; ARAUJO, F.; NEGRONI, J.; CASAREJOS, M. J.; CANALS, S.; SOLANO, R.; SERRANO, A.; GALLEGO, E.; SANCHEZ, M.; DENEFFLE, P.; BENAVIDES, J.; TREMP, G.; ROONEY, T. A.; BRICE, A.; GARCIA DE YEBENES, J. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. **Hum Mol Genet** 2003, 12, 2277-91.

JANKOVIC, J. Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: clinical manifestations. **Mov Disord** 2005, 20 Suppl 11, S11-6.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2008, 79, 368-76.

JENNER, P. The rationale for the use of dopamine agonists in Parkinson's disease. **Neurology** 1995, 45, S6-12.

JI, X.; LUO, Y.; LING, F.; STETLER, R. A.; LAN, J.; CAO, G.; CHEN, J. Mild hypothermia diminishes oxidative DNA damage and pro-death signaling events after cerebral ischemia: a mechanism for neuroprotection. **Front Biosci** 2007, 12, 1737-47.

JIANG, C.; WAN, X.; JANKOVIC, J.; CHRISTIAN, S. T.; PRISTUPA, Z. B.; NIZNIK, H. B.; SUNDSMO, J. S.; LE, W. Dopaminergic properties and experimental anti-parkinsonian effects of IPX750 in rodent models of Parkinson disease. **Clin Neuropharmacol** 2004, 27, 63-73.

JOSEPH, C.; CHASSAN, J. B.; KOCH, M. L. Levodopa in Parkinson disease: a long-term appraisal of mortality. **Ann Neurol** 1978, 3, 116-8.

KALIMAN, P.; PARRIZAS, M.; LALANZA, J. F.; CAMINS, A.; ESCORIHUELA, R. M.; PALLAS, M. Neurophysiological and epigenetic effects of physical exercise on the aging process. **Ageing Res Rev** 2011, 10, 475-86.

KANEOKA, Y.; KOIKE, Y.; SAKURAI, N.; WASHIMI, Y.; HIRAYAMA, M.; HOSHIYAMA, M.; TAKAHASHI, A. Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease detected by electrogastroenterography. **J Auton Nerv Syst** 1995, 50, 275-81.

KANG, M. J.; GIL, S. J.; LEE, J. E.; KOH, H. C. Selective vulnerability of the striatal subregions of C57BL/6 mice to paraquat. **Toxicol Lett** 2010, 195, 127-34.

KANNARI, K.; TANAKA, H.; MAEDA, T.; TOMIYAMA, M.; SUDA, T.; MATSUNAGA, M. Reserpine pretreatment prevents increases in extracellular striatal dopamine following L-DOPA administration in rats with nigrostriatal denervation. **J Neurochem** 2000, 74, 263-9.

KITABATAKE, Y.; HIKIDA, T.; WATANABE, D.; PASTAN, I.; NAKANISHI, S. Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003, 100, 7965-70.

KNAFO, S.; VENERO, C.; MERINO-SERRAIS, P.; FERNAUD-ESPINOSA, I.; GONZALEZ-SORIANO, J.; FERRER, I.; SANTPERE, G.; DEFELIPE, J. Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **J Pathol** 2009, 219, 41-51.

KNOWLER, W. C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S. E.; HAMMAN, R. F.; LACHIN, J. M.; WALKER, E. A.; NATHAN, D. M. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. **N Engl J Med** 2002, 346, 393-403.

KORDOWER, J. H.; CHU, Y.; HAUSER, R. A.; FREEMAN, T. B.; OLANOW, C. W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. **Nat Med** 2008, 14, 504-6.

KRAUS, H.; KIRSTEN, R.; WOLFF, J. R. Effect of swimming and running exercise on the cellular function and structure of muscle. **Pflugers Arch** 1969, 308, 57-79.

KRUEGER, M. J.; SINGER, T. P.; CASIDA, J. E.; RAMSAY, R. R. Evidence that the blockade of mitochondrial respiration by the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) involves binding at the same site as the respiratory inhibitor, rotenone. **Biochem Biophys Res Commun** 1990, 169, 123-8.

- KUZNETSOV, A. V.; STROBL, D.; RUTTMANN, E.; KONIGSRAINER, A.; MARGREITER, R.; GNAIGER, E. Evaluation of mitochondrial respiratory function in small biopsies of liver. **Anal Biochem** 2002, 305, 186-94.
- LAHOSTE, G. J.; YU, J.; MARSHALL, J. F. Striatal Fos expression is indicative of dopamine D₁/D₂ synergism and receptor supersensitivity. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993, 90, 7451-5.
- LANGSTON, J. W.; BALLARD, P.; TETRUD, J. W.; IRWIN, I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science** 1983, 219, 979-80.
- LANGSTON, J. W.; IRWIN, I.; LANGSTON, E. B.; FORNO, L. S. Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. **Science** 1984, 225, 1480-2.
- LANGSTON, J. W.; LANGSTON, E. B.; IRWIN, I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates--clinical and experimental aspects. **Acta Neurol Scand Suppl** 1984, 100, 49-54.
- LANGSTON, J. W.; PALFREMAN, J. **The case of the frozen addicts**. 1995.
- LATASH, M. L.; ANSON, J. G. Synergies in health and disease: relations to adaptive changes in motor coordination. **Phys Ther** 2006, 86, 1151-60.
- LATINI, A.; RODRIGUEZ, M.; BORBA ROSA, R.; SCUSSIATO, K.; LEIPNITZ, G.; REIS DE ASSIS, D.; DA COSTA FERREIRA, G.; FUNCHAL, C.; JACQUES-SILVA, M. C.; BUZIN, L.; GIUGLIANI, R.; CASSINA, A.; RADI, R.; WAJNER, M. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience** 2005, 135, 111-20.
- LAU, Y. S.; FUNG, Y. K. Pharmacological effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on striatal dopamine receptor system. **Brain Res** 1986, 369, 311-5.
- LAU, Y. S.; PATKI, G.; DAS-PANJA, K.; LE, W. D.; AHMAD, S. O. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. **Eur J Neurosci** 2011, 33, 1264-74.
- LAWLOR, D. A.; HOPKER, S. W. The effectiveness of exercise as an intervention in the management of depression: systematic review and meta-regression analysis of randomised controlled trials. **BMJ** 2001, 322, 763-7.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem Res Toxicol** 1992, 5, 227-31.

LEWIS, S. J.; DOVE, A.; ROBBINS, T. W.; BARKER, R. A.; OWEN, A. M. Cognitive impairments in early Parkinson's disease are accompanied by reductions in activity in frontostriatal neural circuitry. **J Neurosci** 2003, 23, 6351-6.

LI, J. Y.; ENGLUND, E.; HOLTON, J. L.; SOULET, D.; HAGELL, P.; LEES, A. J.; LASHLEY, T.; QUINN, N. P.; REHNCRONA, S.; BJORKLUND, A.; WIDNER, H.; REVESZ, T.; LINDVALL, O.; BRUNDIN, P. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. **Nat Med** 2008, 14, 501-3.

LIEBERMAN, A. N.; GOPINATHAN, G.; NEOPHYTIDES, A.; LEIBOWITZ, M.; WALKER, R.; HIESIGER, E. Bromocriptine and lisuride in Parkinson disease. **Ann Neurol** 1983, 13, 44-7.

LINAZASORO, G. New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. **Trends Pharmacol Sci** 2005, 26, 391-7.

LIU, H. H.; TSAI, M. C.; CHEN, C. J.; JENG, J. S.; CHANG, Y. C.; CHEN, S. Y.; CHEN, R. C. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. **Neurology** 1997, 48, 1583-8.

LIU, J.; WANG, M. W.; GU, P.; MA, Q. Y.; WANG, Y. Y.; GENG, Y.; YUAN, Z. Y.; CUI, D. S.; ZHANG, Z. X.; MA, L.; ZHANG, B. H.; ZHOU, M. G.; ZHU, A. P. Microglial activation and age-related dopaminergic neurodegeneration in MPTP-treated SAMP8 mice. **Brain Res** 2010, 1345, 213-20.

LIU, J.; YEO, H. C.; OVERVIK-DOUKI, E.; HAGEN, T.; DONIGER, S. J.; CHYU, D. W.; BROOKS, G. A.; AMES, B. N. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J Appl Physiol** 2000, 89, 21-8.

LOGROSCINO, G.; SESSO, H. D.; PAFFENBARGER, R. S., JR.; LEE, I. M. Physical activity and risk of Parkinson's disease: a prospective cohort study. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2006, 77, 1318-22.

LOMBARDO, T. A.; ROSE, L.; TAESCHLER, M.; TULUY, S.; BING, R. J. The effect of exercise on coronary blood flow, myocardial oxygen consumption and cardiac efficiency in man. **Circulation** 1953, 7, 71-8.

LOPANE, G.; CONTIN, M.; SCAGLIONE, C.; ALBANI, F.; BARUZZI, A.; MARTINELLI, P. The effect of a clinically practical exercise on levodopa bioavailability and motor response in patients with Parkinson disease. **Clin Neuropharmacol** 2010, 33, 254-6.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951, 193, 265-75.

LUGINGER, E.; WENNING, G. K.; BOSCH, S.; POEWE, W. Beneficial effects of amantadine on L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. **Mov Disord** 2000, 15, 873-8.

LUNDBLAD, M.; PICCONI, B.; LINDGREN, H.; CENCI, M. A. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiol Dis** 2004, 16, 110-23.

LUNDBLAD, M.; USIELLO, A.; CARTA, M.; HAKANSSON, K.; FISONE, G.; CENCI, M. A. Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. **Exp Neurol** 2005, 194, 66-75.

LYTLE, M. E.; VANDER BILT, J.; PANDAV, R. S.; DODGE, H. H.; GANGULI, M. Exercise level and cognitive decline: the MoVIES project. **Alzheimer Dis Assoc Disord** 2004, 18, 57-64.

LYYTINEN, J.; KAAKKOLA, S.; GORDIN, A.; KULTALAHTI, E. R.; TERAVAINEN, H.; SOVIJARVI, A. The effect of COMT inhibition with entacapone on cardiorespiratory responses to exercise in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord** 2002, 8, 349-55.

MABANDLA, M.; KELLAWAY, L.; ST CLAIR GIBSON, A.; RUSSELL, V. A. Voluntary running provides neuroprotection in rats after 6-hydroxydopamine injection into the medial forebrain bundle. **Metab Brain Dis** 2004, 19, 43-50.

MABANDLA, M. V.; RUSSELL, V. A. Voluntary exercise reduces the neurotoxic effects of 6-hydroxydopamine in maternally separated rats. **Behav Brain Res** 2010, 211, 16-22.

MACRAE, P. G.; SPIRDUSO, W. W.; CARTEE, G. D.; FARRAR, R. P.; WILCOX, R. E. Endurance training effects on striatal D₂ dopamine receptor binding and striatal dopamine metabolite levels. **Neurosci Lett** 1987, 79, 138-44.

MAK, M. K.; HUI-CHAN, C. W. Cued task-specific training is better than exercise in improving sit-to-stand in patients with Parkinson's disease: A randomized controlled trial. **Mov Disord** 2008, 23, 501-9.

MARAIS, L.; STEIN, D. J.; DANIELS, W. M. Exercise increases BDNF levels in the striatum and decreases depressive-like behavior in chronically stressed rats. **Metab Brain Dis** 2009, 24, 587-97.

MARGONIS, K.; FATOUROS, I. G.; JAMURTAS, A. Z.; NIKOLAIDIS, M. G.; DOUROUDOS, I.; CHATZINIKOLAOU, A.; MITRAKOU, A.; MASTORAKOS, G.; PAPASSOTIRIOU, I.; TAXILDARIS, K.; KOURETAS, D. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. **Free Radic Biol Med** 2007, 43, 901-10.

MARSHALL, J. F.; COLE, B. N.; LAHOSTE, G. J. Dopamine D₂ receptor control of pallidal fos expression: comparisons between intact and 6-hydroxydopamine-treated hemispheres. **Brain Res** 1993, 632, 308-13.

MATTSON, M. P. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. **Brain Res** 2000, 886, 47-53.

MEISSNER, W. G.; FRASIER, M.; GASSER, T.; GOETZ, C. G.; LOZANO, A.; PICCINI, P.; OBESO, J. A.; RASCOL, O.; SCHAPIRA, A.; VOON, V.; WEINER, D. M.; TISON, F.; BEZARD, E. Priorities in Parkinson's disease research. **Nat Rev Drug Discov** 2011, 10, 377-93.

MENDEZ, J. S.; FINN, B. W. Use of 6-hydroxydopamine to create lesions in catecholamine neurons in rats. **J Neurosurg** 1975, 42, 166-73.

MESHI, D.; DREW, M. R.; SAXE, M.; ANSORGE, M. S.; DAVID, D.; SANTARELLI, L.; MALAPANI, C.; MOORE, H.; HEN, R. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. **Nat Neurosci** 2006, 9, 729-31.

MIHARA, T.; MIHARA, K.; YARIMIZU, J.; MITANI, Y.; MATSUDA, R.; YAMAMOTO, H.; AOKI, S.; AKAHANE, A.; IWASHITA, A.; MATSUOKA, N. Pharmacological characterization of a novel, potent adenosine A₁ and A_{2A} receptor dual antagonist, 5-[5-amino-3-(4-fluorophenyl)pyrazin-2-yl]-1-isopropylpyridine-2(1H)-one (ASP5854), in models of Parkinson's disease and cognition. **J Pharmacol Exp Ther** 2007, 323, 708-19.

MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. **J Pharmacol Exp Ther** 1994, 270, 752-60.

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

MIZUNO, Y.; OHTA, S.; TANAKA, M.; TAKAMIYA, S.; SUZUKI, K.; SATO, T.; OYA, H.; OZAWA, T.; KAGAWA, Y. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. **Biochem Biophys Res Commun** 1989, 163, 1450-5.

MOLEMAN, P.; JANZEN, G.; VON BARGEN, B. A.; KAPPERS, E. J.; PEPPLINKHUIZEN, L.; SCHMITZ, P. I. Relationship between age and incidence of parkinsonism in psychiatric patients treated with haloperidol. **Am J Psychiatry** 1986, 143, 232-4.

MOON, M.; KIM, H. G.; HWANG, L.; SEO, J. H.; KIM, S.; HWANG, S.; LEE, D.; CHUNG, H.; OH, M. S.; LEE, K. T.; PARK, S. Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. **Neurotox Res** 2009, 15, 332-47.

MOREIRA, E. L.; RIAL, D.; AGUIAR, A. S., JR.; FIGUEIREDO, C. P.; SIQUEIRA, J. M.; DALBO, S.; HORST, H.; DE OLIVEIRA, J.; MANCINI, G.; DOS SANTOS, T. S.; VILLARINHO, J. G.; PINHEIRO, F. V.; MARINO-NETO, J.; FERREIRA, J.; DE BEM, A. F.; LATINI, A.; PIZZOLATTI, M. G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; PREDIGER, R. D. Proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* Baill confers neuroprotection in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine rat model of Parkinson's disease. **J Neural Transm** 2010, 117, 1337-51.

MORELLI, M.; WARDAS, J. Adenosine A(2a) receptor antagonists: potential therapeutic and neuroprotective effects in Parkinson's disease. **Neurotox Res** 2001, 3, 545-56.

MORGAN, D. P.; KAO, F.; LIM, T. P.; GRODINS, F. S. Temperature and respiratory responses in exercise. **Am J Physiol** 1955, 183, 454-8.

MORRIS, R. G.; GARRUD, P.; RAWLINS, J. N.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature** 1982, 297, 681-3.

MOURADIAN, M. M.; JUNCOS, J. L.; SERRATI, C.; FABBRINI, G.; PALMERI, S.; CHASE, T. N. Exercise and the antiparkinsonian response to levodopa. **Clin Neuropharmacol** 1987, 10, 351-5.

MOY, L. Y.; ALBERS, D. S.; SONSALLA, P. K. Lowering ambient or core body temperature elevates striatal MPP⁺ levels and enhances toxicity to dopamine neurons in MPTP-treated mice. **Brain Res** 1998, 790, 264-9.

MU, X.; HE, G. R.; YUAN, X.; LI, X. X.; DU, G. H. Baicalein protects the brain against neuron impairments induced by MPTP in C57BL/6 mice. **Pharmacol Biochem Behav** 2011, 98, 286-91.

MUENTER, M. D.; TYCE, G. M. L-dopa therapy of Parkinson's disease: plasma L-dopa concentration, therapeutic response, and side effects. **Mayo Clin Proc** 1971, 46, 231-9.

MUHLACK, S.; WELNIC, J.; WOITALLA, D.; MULLER, T. Exercise improves efficacy of levodopa in patients with Parkinson's disease. **Mov Disord** 2007, 22, 427-30.

- MURALIKRISHNAN, D.; SAMANTARAY, S.; MOHANAKUMAR, K. P. D-deprenyl protects nigrostriatal neurons against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurotoxicity. **Synapse** 2003, 50, 7-13.
- MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; DA CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Res Bull** 2002, 58: 41-7.
- NAGERA, J. M.; GNOCCHI, O. Kinesitherapy of Parkinsonism; kinetic therapy should not be omitted; clinicokinetic and biopharmacodynamic aspects. **Dia Med** 1955, 27, 397-8.
- NAVARRO, A.; GOMEZ, C.; LOPEZ-CEPERO, J. M.; BOVERIS, A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 2004, 286, R505-11.
- NEVE, K. A.; NEVE, R. L.; FIDEL, S.; JANOWSKY, A.; HIGGINS, G. A. Increased abundance of alternatively spliced forms of D2 dopamine receptor mRNA after denervation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991, 88, 2802-6.
- NICHOLL, J. P.; COLEMAN, P.; BRAZIER, J. E. Health and healthcare costs and benefits of exercise. **Pharmacoeconomics** 1994, 5, 109-22.
- NIEUWBOER, A.; KWAKKEL, G.; ROCHESTER, L.; JONES, D.; VAN WEGEN, E.; WILLEMS, A. M.; CHAVRET, F.; HETHERINGTON, V.; BAKER, K.; LIM, I. Cueing training in the home improves gait-related mobility in Parkinson's disease: the RESCUE trial. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2007, 78, 134-40.
- OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; GOETZ, C. G.; MARIN, C.; KORDOWER, J. H.; RODRIGUEZ, M.; HIRSCH, E. C.; FARRER, M.; SCHAPIRA, A. H.; HALLIDAY, G. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nat Med** 2009, 16, 653-61.
- OEHME, F. W.; MANNALA, S. **Pest control agents from natural products**. In: KRIEGER, R. I. (Ed.). Handbook of pesticide toxicology: principles and agents. San Diego: Academic Press, 2001, 109-180.
- OLANOW, C. W.; TATTON, W. G. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Annu Rev Neurosci** 1999, 22, 123-44.
- OLIVEIRA, I. J.; MOLZ, S.; SOUZA, D. O.; TASCA, C. I. Neuroprotective effect of GMP in hippocampal slices submitted to an in vitro model of ischemia. **Cell Mol Neurobiol** 2002, 22, 335-44.

- PACKARD, M. G.; KNOWLTON, B. J. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. **Annu Rev Neurosci** 2002, 25, 563-93.
- PADOVAN-NETO, F. E.; ECHEVERRY, M. B.; TUMAS, V.; DEL-BEL, E. A. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. **Neuroscience** 2009, 159, 927-35.
- PAFFENBARGER, R. S., JR.; BLAIR, S. N.; LEE, I. M. A history of physical activity, cardiovascular health and longevity: the scientific contributions of Jeremy N Morris, DSc, DPH, FRCP. **Int J Epidemiol** 2001, 30, 1184-92.
- PAPA, S. M.; CHASE, T. N. Levodopa-induced dyskinesias improved by a glutamate antagonist in Parkinsonian monkeys. **Ann Neurol** 1996, 39, 574-8.
- PARENT, A.; HAZRATI, L. N. Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. **Brain Res Brain Res Rev** 1995, 20, 91-127.
- PARENT, M.; PARENT, A. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. **Can J Neurol Sci** 2010, 37, 313-9.
- PARKER, W. D., JR.; BOYSON, S. J.; PARKS, J. K. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. **Ann Neurol** 1989, 26, 719-23.
- PARKES, J. D. Adverse effects of antiparkinsonian drugs. **Drugs** 1981, 21, 341-53.
- PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci** 2002, 14, 223-36; discussion 222.
- PAVON, N.; MARTIN, A. B.; MENDIALDUA, A.; MORATALLA, R. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. **Biol Psychiatry** 2006, 59, 64-74.
- PAULA, L. S.; ISABELLA, C. N.; MÔNICA, R. M.; DANIEL, R. C. S.; FRANCISCO, F.; HENRIQUE, B. F.; TEIXEIRA, A. L. Validation of the brazilian version of the berg balance scale for patients with parkinson's disease. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** 2009, 67, 831-835.
- PETAJAN, J. H.; GAPPMAIER, E.; WHITE, A. T.; SPENCER, M. K.; MINO, L.; HICKS, R. W. Impact of aerobic training on fitness and quality of life in multiple sclerosis. **Ann Neurol** 1996, 39, 432-41.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal Biochem** 1977, 83, 346-56.

PETZINGER, G. M.; FISHER, B. E.; VAN LEEUWEN, J. E.; VUKOVIC, M.; AKOPIAN, G.; MESHUL, C. K.; HOLSCHNEIDER, D. P.; NACCA, A.; WALSH, J. P.; JAKOWEC, M. W. Enhancing neuroplasticity in the basal ganglia: the role of exercise in Parkinson's disease. **Mov Disord** 2010, 25 Suppl 1, S141-5.

PETZINGER, G. M.; WALSH, J. P.; AKOPIAN, G.; HOGG, E.; ABERNATHY, A.; AREVALO, P.; TURNQUIST, P.; VUCKOVIC, M.; FISHER, B. E.; TOGASAKI, D. M.; JAKOWEC, M. W. Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. **J Neurosci** 2007, 27, 5291-300.

PICCONI, B.; CENTONZE, D.; HAKANSSON, K.; BERNARDI, G.; GREENGARD, P.; FISONE, G.; CENCI, M. A.; CALABRESI, P. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat Neurosci** 2003, 6, 501-6.

POLYMEROPOULOS, M. H. **Autosomal dominant Parkinson's disease and alpha-synuclein**. In: OLANOW, C. W. J., P. (Ed.). *Beyond the decade of the brain: neuroprotection in Parkinson's disease*. Wells Medical Ltd, 1998, 121-123.

POLYMEROPOULOS, M. H.; HIGGINS, J. J.; GOLBE, L. I.; JOHNSON, W. G.; IDE, S. E.; DI IORIO, G.; SANGES, G.; STENROOS, E. S.; PHO, L. T.; SCHAFFER, A. A.; LAZZARINI, A. M.; NUSSBAUM, R. L.; DUVOISIN, R. C. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science** 1996, 274, 1197-9.

POLYMEROPOULOS, M. H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E.; IDE, S. E.; DEHEJIA, A.; DUTRA, A.; PIKE, B.; ROOT, H.; RUBENSTEIN, J.; BOYER, R.; STENROOS, E. S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.; ATHANASSIADOU, A.; PAPAPETROPOULOS, T.; JOHNSON, W. G.; LAZZARINI, A. M.; DUVOISIN, R. C.; DI IORIO, G.; GOLBE, L. I.; NUSSBAUM, R. L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science** 1997, 276, 2045-7.

POTHAKOS, K.; KURZ, M. J.; LAU, Y. S. Restorative effect of endurance exercise on behavioral deficits in the chronic mouse model of Parkinson's disease with severe neurodegeneration. **BMC Neurosci** 2009, 10, 6.

POULTON, N. P.; MUIR, G. D. Treadmill training ameliorates dopamine loss but not behavioral deficits in hemi-parkinsonian rats. **Exp Neurol** 2005, 193, 181-97.

PREDIGER, R. D.; AGUIAR, A. S., JR.; MOREIRA, E. L.; MATHEUS, F. C.; CASTRO, A. A.; WALZ, R.; DE BEM, A. F.; LATINI, A.; TASCA, C. I.; FARINA, M.; RAISMAN-VOZARI, R. The Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP): A New Rodent Model to

Test Palliative and Neuroprotective Agents for Parkinson's Disease. **Curr Pharm Des** 2011, 17, 489-507.

PREDIGER, R. D.; AGUIAR, A. S., JR.; ROJAS-MAYORQUIN, A. E.; FIGUEIREDO, C. P.; MATHEUS, F. C.; GINESTET, L.; CHEVARIN, C.; BEL, E. D.; MONGEAU, R.; HAMON, M.; LANFUMEY, L.; RAISMAN-VOZARI, R. Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotox Res** 2010, 17, 114-29.

PREDIGER, R. D.; BATISTA, L. C.; MEDEIROS, R.; PANDOLFO, P.; FLORIO, J. C.; TAKAHASHI, R. N. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Exp Neurol** 2006, 202, 391-403.

PREDIGER, R. D.; RIAL, D.; MEDEIROS, R.; FIGUEIREDO, C. P.; DOTY, R. L.; TAKAHASHI, R. N. Risk is in the air: an intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of Parkinson's disease. **Ann N Y Acad Sci** 2009, 1170, 629-36.

PROTAS, E. J.; MITCHELL, K.; WILLIAMS, A.; QURESHY, H.; CAROLINE, K.; LAI, E. C. Gait and step training to reduce falls in Parkinson's disease. **NeuroRehabilitation** 2005, 20, 183-90.

RAMSAY, R. R.; SALACH, J. I.; SINGER, T. P. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD⁺-linked substrates by MPP⁺. **Biochem Biophys Res Commun** 1986, 134, 743-8.

RANKE, G. Gymnastic methods in the treatment of bronchial asthma in childhood. **Münchener medizinische Wochenschrift** 1950, 92, 1310-1315.

RASCOL, O.; ARNULF, I.; PEYRO-SAINT PAUL, H.; BREFEL-COURBON, C.; VIDAILHET, M.; THALAMAS, C.; BONNET, A. M.; DESCOMBES, S.; BEJJANI, B.; FABRE, N.; MONTASTRUC, J. L.; AGID, Y. Idazoxan, an alpha-2 antagonist, and L-DOPA-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease. **Mov Disord** 2001, 16, 708-13.

RENNER, K.; AMBERGER, A.; KONWALINKA, G.; KOFLER, R.; GNAIGER, E. Changes of mitochondrial respiration, mitochondrial content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells. **Biochim Biophys Acta** 2003, 1642, 115-23.

REUTER, I.; HARDER, S.; ENGELHARDT, M.; BAAS, H. The effect of exercise on pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa. **Mov Disord** 2000, 15, 862-8.

RICAURTE, G. A.; IRWIN, I.; FORNO, L. S.; DELANNEY, L. E.; LANGSTON, E.; LANGSTON, J. W. Aging and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra. **Brain Res** 1987, 403, 43-51.

RIEDERER, P.; WUKETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. **J Neural Transm** 1976, 38, 277-301.

ROBELET, S.; MELON, C.; GUILLET, B.; SALIN, P.; KERKERIAN-LE GOFF, L. Chronic L-DOPA treatment increases extracellular glutamate levels and GLT₁ expression in the basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci** 2004, 20, 1255-66.

ROJO, A. I.; MONTERO, C.; SALAZAR, M.; CLOSE, R. M.; FERNANDEZ-RUIZ, J.; SANCHEZ-GONZALEZ, M. A.; DE SAGARRA, M. R.; JACKSON-LEWIS, V.; CAVADA, C.; CUADRADO, A. Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. **Eur J Neurosci** 2006, 24, 1874-84.

ROOF, R. L.; SCHIELKE, G. P.; REN, X.; HALL, E. D. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. **Stroke** 2001, 32, 2648-57.

RYE, D. B.; JOHNSTON, L. H.; WATTS, R. L.; BLIWISE, D. L. Juvenile Parkinson's disease with REM sleep behavior disorder, sleepiness, and daytime REM onset. **Neurology** 1999, 53, 1868-70.

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

SACKS, O. W.; KOHL, M. Incontinent nostalgia induced by L-dopa. **Lancet** 1970a, 1, 1394.

SACKS, O. W.; KOHL, M. L-dopa and oculogyric crises. **Lancet** 1970b, 2, 215-6.

SACKS, O. W.; MESSELOFF, C. R.; SCHWARTZ, W. F. Long-term effects of levodopa in the severely disabled patient. **JAMA** 1970, 213, 2270.

SAMADI, P.; BEDARD, P. J.; ROUILLARD, C. Opioids and motor complications in Parkinson's disease. **Trends Pharmacol Sci** 2006, 27, 512-7.

SAMORAJSKI, T.; ROLSTEN, C.; PRZYKORSKA, A.; DAVIS, C. M. Voluntary wheel running exercise and monoamine levels in brain, heart and adrenal glands of aging mice. **Exp Gerontol** 1987, 22, 421-31.

SANTINI, E.; VALJENT, E.; USIELLO, A.; CARTA, M.; BORGKVIST, A.; GIRAULT, J. A.; HERVE, D.; GREENGARD, P.; FISONE, G. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. **J Neurosci** 2007, 27, 6995-7005.

SCHALLERT, T.; WOODLEE, M. T. Brain-dependent movements and cerebral-spinal connections: key targets of cellular and behavioral enrichment in CNS injury models. **J Rehabil Res Dev** 2003, 40, 9-17.

SCHAPIRA, A. H.; COOPER, J. M.; DEXTER, D.; CLARK, J. B.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **J Neurochem** 1990, 54, 823-7.

SCHNEIDER, J. S. Chronic exposure to low doses of MPTP. II. Neurochemical and pathological consequences in cognitively-impaired, motor asymptomatic monkeys. **Brain Res** 1990, 534, 25-36.

SCHRAG, A. Entacapone in the treatment of Parkinson's disease. **Lancet Neurol** 2005, 4, 366-70.

SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Prog Neurobiol** 1996, 50, 275-331.

SEEMAN, P.; VANTOL, H. H. M. Dopamine-Receptor Pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences** 1994, 15, 264-270.

SENOH, S.; WITKOP, B.; CREVELING, C.R.; UDENFRIEND, S. 2,4,5-trihydroxyphenethylamine, a new metabolite of 3,4-dihydroxyphenethylamine. **J Am Chem Soc** 1959, 81, 1768-1769.

SHEN, X. M.; DRYHURST, G. Further insights into the influence of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: reaction pathways of potential relevance to Parkinson's disease. **Chem Res Toxicol** 1996, 9, 751-63.

SHIOZAKI, S.; ICHIKAWA, S.; NAKAMURA, J.; KITAMURA, S.; YAMADA, K.; KUWANA, Y. Actions of adenosine A_{2A} receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. **Psychopharmacology (Berl)** 1999, 147, 90-5.

SIMUNI, T.; SETHI, K. Nonmotor manifestations of Parkinson's disease. **Ann Neurol** 2008, 64 Suppl 2, S65-80.

SJOSTEN, N.; KIVELA, S. L. The effects of physical exercise on depressive symptoms among the aged: a systematic review. **Int J Geriatr Psychiatry** 2006, 21, 410-8.

SMITH, A. D.; ZIGMOND, M. J. Can the brain be protected through exercise? Lessons from an animal model of parkinsonism. **Exp Neurol** 2003, 184, 31-9.

SMITH, B. A.; GOLDBERG, N. R.; 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 Res** 2011, 1386, 70-80.

SMITH, R.; MUSLEH, W.; AKOPIAN, G.; BUCKWALTER, G.; WALSH, J. P. Regional differences in the expression of corticostriatal synaptic plasticity. **Neuroscience** 2001, 106, 95-101.

SMITH, Y.; VILLALBA, R. M.; RAJU, D. V. Striatal spine plasticity in Parkinson's disease: pathological or not? **Parkinsonism Relat Disord** 2009, 15 Suppl 3, S156-61.

SOLFRIZZI, V.; CAPURSO, C.; D'INTRONO, A.; COLACICCO, A. M.; SANTAMATO, A.; RANIERI, M.; FIORE, P.; CAPURSO, A.; PANZA, F. Lifestyle-related factors in predementia and dementia syndromes. **Expert Rev Neurother** 2008, 8, 133-58.

SOMANI, S. M.; HUSAIN, K. Interaction of exercise training and chronic ethanol ingestion on antioxidant system of rat brain regions. **J Appl Toxicol** 1997, 17, 329-36.

SOSSI, V.; DE LA FUENTE-FERNANDEZ, R.; NANDHAGOPAL, R.; SCHULZER, M.; MCKENZIE, J.; RUTH, T. J.; AASLY, J. O.; FARRER, M. J.; WSZOLEK, Z. K.; STOESSL, J. A. Dopamine turnover increases in asymptomatic LRRK2 mutations carriers. **Mov Disord** 2010, 25, 2717-23.

SOTO-OTERO, R.; MENDEZ-ALVAREZ, E.; HERMIDA-AMEIJEIRAS, A.; LOPEZ-REAL, A. M.; LABANDEIRA-GARCIA, J. L. Effects of (-)-nicotine and (-)-cotinine on 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress and neurotoxicity: relevance for Parkinson's disease. **Biochem Pharmacol** 2002, 64, 125-35.

SOTO-OTERO, R.; MENDEZ-ALVAREZ, E.; HERMIDA-AMEIJEIRAS, A.; MUNOZ-PATINO, A. M.; LABANDEIRA-GARCIA, J. L. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. **J Neurochem** 2000, 74, 1605-12.

SPANAGEL, R.; WEISS, F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. **Trends Neurosci** 1999, 22, 521-7.

SPOOREN, W. P.; VASSOUT, A.; WALDMEIER, P.; GENTSCH, C. Differences in pre- and post-synaptic sensitivity to apomorphine between saline and 1-methyl-4-

phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57BL/6 mice as reflected in climbing activity. **Eur J Pharmacol** 1998, 353, 1-4.

STEBBINS, G. T.; GABRIELI, J. D.; MASCIARI, F.; MONTI, L.; GOETZ, C. G. Delayed recognition memory in Parkinson's disease: a role for working memory? **Neuropsychologia** 1999, 37, 503-10.

STENSTROM, A.; SUNDSTROM, E.; FOWLER, C. J. Comparison of intra- and extrasynaptosomal monoamine oxidase-A and -B activities in the striatum and frontal cortex of two mice strains with different sensitivities to the neurotoxic actions of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Pharmacol Toxicol** 1989, 64, 276-81.

STONE, C. A., STAVORSKI, J.M., LUDDEN, C.T., WENGLER, H.C., ROSS, C.A., TOTARO, J.A., PORTER, C.C. Comparison of the some pharmacological effects of certain 6-substituted dopamine derivatives with the reserpine guanethidine and metaraminol. **J Pharmacol Exp Ther** 1963, 147-156.

SUNDBERG, S.; SCHEININ, M.; ILLI, A.; AKKILA, J.; GORDIN, A.; KERANEN, T. The effects of the COMT inhibitor entacapone on haemodynamics and peripheral catecholamine metabolism during exercise. **Br J Clin Pharmacol** 1993, 36, 451-6.

SUNDSTROM, E.; FREDRIKSSON, A.; ARCHER, T. Chronic neurochemical and behavioral changes in MPTP-lesioned C57BL/6 mice: a model for Parkinson's disease. **Brain Res** 1990, 528, 181-8.

SWARNKAR, S.; SINGH, S.; MATHUR, R.; PATRO, I. K.; NATH, C. A study to correlate rotenone induced biochemical changes and cerebral damage in brain areas with neuromuscular coordination in rats. **Toxicology** 2010, 272, 17-22.

SYLVAN, F. Myelitis treated with Gymnastic Exercises. **Proc R Soc Med** 1913a, 6, 183-184.

SYLVAN, F. Pulmonary Tuberculosis before and after Gymnastic Treatment. **Proc R Soc Med** 1913b, 6, 182-183.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI, P. A.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R. N. Effects of SR141716A on Cognitive and Depression-Related Behavior in an Animal Model of Premotor Parkinson's Disease. **Parkinsons Dis** 2010, 2010, 238491.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI, P. A.; FIGUEIREDO, C. P.; CARGNIN-FERREIRA, E.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R. N. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience** 2008, 156, 830-40.

TAJIRI, N.; YASUHARA, T.; SHINGO, T.; KONDO, A.; YUAN, W.; KADOTA, T.; WANG, F.; BABA, T.; TAYRA, J. T.; MORIMOTO, T.; JING, M.; KIKUCHI, Y.; KURAMOTO, S.; AGARI, T.; MIYOSHI, Y.; FUJINO, H.; OBATA, F.; TAKEDA, I.; FURUTA, T.; DATE, I. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats. **Brain Res** 2010, 1310, 200-7.

TAVARES, R. G.; TASCA, C. I.; SANTOS, C. E.; ALVES, L. B.; PORCIUNCULA, L. O.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. **Neurochem Int** 2002, 40, 621-7.

TEIXEIRA, A.; MULLER, L. G.; RECKZIEGEL, P.; BOUFLEUR, N.; PASE, C. S.; VILLARINHO, J. G.; FACHINETTO, R.; FERREIRA, J.; ROCHA, J. B.; BURGER, M. E. Beneficial effects of an innovative exercise model on motor and oxidative disorders induced by haloperidol in rats. **Neuropharmacology** 2011, 60, 432-8.

TERRY, A. V., JR. **Spatial Navigation (Water Maze) Tasks**. In: BUCCAFUSCO, J. J. (Ed.). *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. Boca Raton: CRC Press, 2009, 153-66.

THAL, D. R.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. Neurodegeneration in normal brain aging and disease. **Sci Aging Knowledge Environ** 2004, 2004, pe26.

THRELFELL, S.; CRAGG, S. J. Dopamine signaling in dorsal versus ventral striatum: the dynamic role of cholinergic interneurons. **Front Syst Neurosci** 2011, 5, 11.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Anal Biochem** 1969, 27, 502-22.

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

TREJO, J. L.; CARRO, E.; NUNEZ, A.; TORRES-ALEMAN, I. Sedentary life impairs self-reparative processes in the brain: the role of serum insulin-like growth factor-I. **Rev Neurosci** 2002, 13, 365-74.

TRESEDER, S. A.; SMITH, L. A.; JENNER, P. Endogenous dopaminergic tone and dopamine agonist action. **Mov Disord** 2000, 15, 804-12.

TURRENS, J. F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosci Rep** 1997, 17, 3-8.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J** 1980, 191, 421-7.

TYMIANSKI, M.; SATTLER, R.; ZABRAMSKI, J. M.; SPETZLER, R. F. Characterization of neuroprotection from excitotoxicity by moderate and profound hypothermia in cultured cortical neurons unmasks a temperature-insensitive component of glutamate neurotoxicity. **J Cereb Blood Flow Metab** 1998, 18, 848-67.

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

VANLEEUEWEN, J. E.; PETZINGER, G. M.; WALSH, J. P.; AKOPIAN, G. K.; VUCKOVIC, M.; JAKOWEC, M. W. Altered AMPA receptor expression with treadmill exercise in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. **J Neurosci Res** 2010, 88, 650-68.

VILLABLANCA, J. R.; MARCUS, R. J. The basal ganglia. A brief review and interpretation. **Acta Neurol Latinoam** 1975, 21, 157-83.

VILLALBA, R. M.; LEE, H.; SMITH, Y. Dopaminergic denervation and spine loss in the striatum of MPTP-treated monkeys. **Exp Neurol** 2009, 215, 220-7.

VILLAR-CHEDA, B.; SOUSA-RIBEIRO, D.; RODRIGUEZ-PALLARES, J.; RODRIGUEZ-PEREZ, A. I.; GUERRA, M. J.; LABANDEIRA-GARCIA, J. L. Aging and sedentarism decrease vascularization and VEGF levels in the rat substantia nigra. Implications for Parkinson's disease. **J Cereb Blood Flow Metab** 2009, 29, 230-4.

VOGT, C. Quelques considerations generales sur le syndrome du corps strie. **J. Psychol. Neurol. (Leipzig)** 1911, 18, 479-88.

VOLLER, G. W.; DEZE, J.; GUNDLACH, U.; MUSCHARD, F. Problems and therapy of L-DOPA-induced dyskinesias. **Nervenarzt** 1972, 43, 584-6.

VOON, V.; FERNAGUT, P. O.; WICKENS, J.; BAUNEZ, C.; RODRIGUEZ, M.; PAVON, N.; JUNCOS, J. L.; OBESO, J. A.; BEZARD, E. Chronic dopaminergic stimulation in Parkinson's disease: from dyskinesias to impulse control disorders. **Lancet Neurol** 2009, 8, 1140-9.

VUČKOVIC, M. G.; LI, Q.; FISHER, B.; NACCA, A.; LEAHY, R. M.; WALSH, J. P.; MUKHERJEE, J.; WILLIAMS, C.; JAKOWEC, M. W.; PETZINGER, G. M. Exercise elevates dopamine D₂ receptor in a mouse model of Parkinson's disease: in vivo imaging with [¹F]fallypride. **Mov Disord** 2010, 25, 2777-84.

VUCKOVIC, M. G.; WOOD, R. I.; HOLSCHNEIDER, D. P.; ABERNATHY, A.; TOGASAKI, D. M.; SMITH, A.; PETZINGER, G. M.; JAKOWEC, M. W. Memory, mood, dopamine, and serotonin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. **Neurobiol Dis** 2008, 32, 319-27.

WALKER, J. A. The advantage of systematic exercise, as a mean of restoring health. **The Lancet** 1840, 35, 86.

WARD, J. P. Mitochondria and oxygen sensing: fueling the controversy. **J Physiol** 2003, 548, 664.

WATERS, R. E.; ROTEVATN, S.; LI, P.; ANNEX, B. H.; YAN, Z. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. **Am J Physiol Cell Physiol** 2004, 287, C1342-8.

WEIHMULLER, F. B.; HADJICONSTANTINO, M.; BRUNO, J. P. Dopamine receptors and sensorimotor behavior in MPTP-treated mice. **Behav Brain Res** 1990, 38, 263-73.

WEINTRAUB, D. Dopamine and impulse control disorders in Parkinson's disease. **Ann Neurol** 2008, 64 Suppl 2, S93-100.

WHITE, R. P.; WESTERBEKE, E. J. Differences in central anticholinergic actions of phenothiazine derivatives. **Exp Neurol** 1961, 4, 317-29.

WILLIAMS, A.; GILL, S.; VARMA, T.; JENKINSON, C.; QUINN, N.; MITCHELL, R.; SCOTT, R.; IVES, N.; RICK, C.; DANIELS, J.; PATEL, S.; WHEATLEY, K. 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. **Lancet Neurol** 2010, 9, 581-91.

WILSON, S. A. K. Progressive lenticular degeneration: a familiar nervous disease associated with cirrhosis of the liver. **Brain** 1912,

WILSON, S. A. K. An experimental research into the anatomy of the corpus striatum. **Brain** 1914, 36, 427-92.

WINKLER, C.; KIRIK, D.; BJORKLUND, A.; CENCI, M. A. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiol Dis** 2002, 10, 165-86.

WRIGHT, J. M.; WALL, R. A.; PERRY, T. L.; PATY, D. W. Chronic parkinsonism secondary to intranasal administration of a product of meperidine-analogue synthesis. **N Engl J Med** 1984, 310, 325.

XU, Q.; PARK, Y.; HUANG, X.; HOLLENBECK, A.; BLAIR, A.; SCHATZKIN, A.; CHEN, H. Physical activities and future risk of Parkinson disease. **Neurology** 2010, 75, 341-8.

YOON, M. C.; SHIN, M. S.; KIM, T. S.; KIM, B. K.; KO, I. G.; SUNG, Y. H.; KIM, S. E.; LEE, H. H.; KIM, Y. P.; KIM, C. J. Treadmill exercise suppresses nigrostriatal dopaminergic neuronal loss in 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's rats. **Neurosci Lett** 2007, 423, 12-7.

YOUNG, D. R.; PELLIGRA, R.; SHAPIRA, J.; ADACHI, R. R.; SKRETTINGLAND, K. Glucose oxidation and replacement during prolonged exercise in man. **J Appl Physiol** 1967, 23, 734-41.

YU, L.; ZHOU, Y.; CHEN, W.; WANG, Y. Mild hypothermia pretreatment protects against pilocarpine-induced status epilepticus and neuronal apoptosis in immature rats. **Neuropathology** 2011, 31, 144-51.

ZESIEWICZ, T. A.; EVATT, M. L. Potential influences of complementary therapy on motor and non-motor complications in Parkinson's disease. **CNS Drugs** 2009, 23, 817-35.

ZHAO, W.; RICHARDSON, J. S.; MOMBOURQUETTE, M. J.; WEIL, J. A.; IJAZ, S.; SHUAIB, A. Neuroprotective effects of hypothermia and U-78517F in cerebral ischemia are due to reducing oxygen-based free radicals: an electron paramagnetic resonance study with gerbils. **J Neurosci Res** 1996, 45, 282-8.

ZIERING, A.; LEE, J. Piperidine derivatives; 1,3-dialkyl-4-aryl-4-acyloxypiperidines. **J Org Chem** 1947, 12, 911-4.

Tabela 7. Estudos investigando os efeitos do exercício físico em modelos experimentais de Parkinsonismo.

Modelo de Parkinsonismo	Modelo de Exercício	Achados
4 x MPTP 20 mg/kg i.p. em camundongos C57BL/6. Department of Neurology, University of Southern California, Los Angeles, EUA (Fisher, Petzinger <i>et al.</i> , 2004; Petzinger, Walsh <i>et al.</i> , 2007; Gorton, Vuckovic <i>et al.</i> , 2010; Vanleeuwen, Petzinger <i>et al.</i> , 2010; Vuckovic, Li <i>et al.</i> , 2010)	Esteira após MPTP, 6 semanas	<p>Comportamento. (i) <u>Coordenação motora</u> (rota-rod): efeito per se do exercício com > comportamental (veículo e MPTP). MPTP sem efeito. (ii) <u>Esconder esferas</u> (<i>marble burying</i>): MPTP é ansiogênico, sem efeito do exercício. (iii) <u>Labirinto em cruz elevado</u>: sem efeito do MPTP ou exercício. (iv) <u>Preferência por sacarose</u>: sem efeito do MPTP ou exercício. (v) <u>Suspensão pela cauda</u>: sem efeito do MPTP ou exercício.</p> <p>Estriado. (vi) <u>HPLC</u>: exercício sem efeito depleção DA, DOPAC e HVA induzida pelo MPTP. (vii) <u>WB e IHQ</u>: exercício aumenta lesão proteínas TH e DAT induzida pelo MPTP. Exercício aumenta expressão Da₂R (vi) <u>Voltametria</u>: efeito per se do exercício na < taxa decaimento DA (veículo e MPTP). (viii) <u>Ensaio com radioisótopos</u>: MPTP aumenta afinidade Da₂R, exercício sem efeito. (ix) <u>Eletrofisiologia</u>: exercício diminui condutância do AMPAR (> expressão e fosforilação subunidade Glu2 AMPAR). <i>S.Npc.</i> (x) <u>IHQ</u>: exercício sem efeito na lesão aos neurônios TH+.</p>
4 x MPTP 20 mg/kg i.p. em camundongos C57BL/6 (Gerecke, Jiao <i>et al.</i> , 2010)	Rodas de correr; 4, 8 ou 12 semanas antes do MPTP	<p><i>S.Npc.</i> <u>IHQ</u>: a partir de 8 semanas de exercício, proteção parcial contra morte TH. <u>HPLC</u>: sem efeito do exercício na depleção DA, DOPAC e HVA.</p>
10 x MPTP 15 mg/kg s.c. + probenecid 250 mg/kg i.p. em camundongos C57BL/6 (Lau, Patki <i>et al.</i> , 2011)	Esteira após MPTP, 12 semanas	<p>Comportamento. <u>Barra suspensa</u>: exercício reverte prejuízo motor. <i>S.Npc.</i> <u>IHQ</u>: reversão parcial lesão neurônios TH+. <u>Neurotrofinas</u>: aumento níveis BDNF no grupo exe-MPTP, sem efeito GDNF.</p> <p>Estriado. <u>WB</u>: reversão parcial lesão TH e DAT. <u>HPLC</u>: sem efeito do exercício na depleção DA. Estudo mitocondrial: MPTP prejudica consumo O₂ e produção ATP nos estados III e IV mitocondrial, com reversão parcial pelo exercício. <u>Neurotrofinas</u>: aumento níveis BDNF e GDNF no grupo exe-MPTP.</p>

Continuação da Tabela 7

Modelo de Parkinsonismo	Modelo de Exercício	Achados
10 x MPTP 25 mg/kg s.c. + probenecid 250 mg/kg i.p. em camundongos C57BL/6 (Al-Jarrah, Jamous <i>et al.</i> , 2010)	Esteira após MPTP, 4 semanas	Ergometria. <u>Teste físico</u> : exercício aumentou VO ₂ max nos grupos veículo e MPTP. Comportamento. <u>Desafio D-anfetamina</u> : locomoção menor nos animais tratados com MPTP, sem efeito do exercício. Estriado e S_Npc. <u>WB</u> : sem efeito do exercício na lesão TH. <u>HPLC</u> : sem efeito do exercício na depleção DA e DOPAC
7 x MPTP 30 mg/kg i.p. em camundongos C57BL/6 (Smith, Goldberg <i>et al.</i> , 2011)	Esteira após MPTP, 3 semanas	Comportamento. Caixa de atividade: exercício e lesão sem efeito. Estriado. IHQ: exercício sem efeito na lesão TH e DAT.
1 x 10µg 6-OHDA feixe prosencefálico medial em ratos Fisher 2 x MPTP 15 mg/kg s.c. em camundongos C57BL/6 (Tillerson, Caudle <i>et al.</i> , 2003)	Esteira após 6-OHDA/MPTP, 4 semanas	Comportamento. <u>Marcha</u> : exercício diminui assimetria e acinesia induzida pelo 6-OHDA nos ratos. Estriado. <u>HPLC</u> e <u>WB</u> : exercício diminui depleção DA, DOPAC e HVA e lesão TH, VMAT2 e DAT em ratos e camundongos.
1 x 10µg 6-OHDA feixe prosencefálico medial em ratos Long-Evans (Mabandla, Kellaway <i>et al.</i> , 2004)	Rodas de correr após 6-OHDA, 2 semanas	Comportamento. <u>Desafio R(-)-apomorfina</u> : exercício diminui rotações nos ratos lesionados.
2 x 10µg 6-OHDA feixe prosencefálico medial em ratos Long-Evans (Poulton e Muir, 2005)	Esteira após 6-OHDA, 4 semanas	Comportamento. <u>Desafio R(-)-apomorfina</u> : exercício diminui rotações nos ratos lesionados. Estriado. <u>HPLC</u> : exercício diminui depleção DA e DOPAC.
1 x 10µg 6-OHDA estriado em ratos Sprague-Dawley (Yoon, Shin <i>et al.</i> , 2007; Tajiri, Yasuhara <i>et al.</i> , 2010)		Comportamento. <u>Desafio R(-)-apomorfina</u> : exercício diminui rotações nos ratos lesionados. <u>Cilindro</u> : exercício diminui a assimetria induzida pela lesão. Estriado. <u>IHQ</u> : menor lesão TH. <u>WB</u> : maior quantidade BDNF e GDNF no grupo exe-6-OHDA. S_Npc. <u>IHQ</u> : menor lesão TH.

Abreviações: DA – dopamina; DAT – transportador de dopamina; DOPAC – ácido diidrofenilacético; HPLC – cromatografia líquida de alto desempenho; HVA – ácido homovanílico; IHQ – imunistoquímica; i.p. – intraperitoneal; MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; s.c. – subcutâneo; TH – tirosina hidroxilase; VMAT2 – transportador vesicular de monoaminas; WB – western blot; 6-OHDA – 6-hidroxidopamina.