

Débora da Luz Scheffer

**METABOLISMO DAS PTERINAS E DA DOPAMINA EM
MECANISMOS DE NOCICEPÇÃO E FADIGA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Educação Física da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Educação Física.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra Susana Latini

Coorientador: Dr. Aderbal Silva Aguiar Junior

Florianópolis
2017

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

Scheffer, Débora da Luz
METABOLISMO DAS PTERINAS E DA DOPAMINA EM
MECANISMOS DE NOCICEPÇÃO E FADIGA / Débora da Luz
Scheffer ; orientadora, Alexandra Susana Latini,
coorientador, Aderbal Silva Aguiar Junior, 2017.
146 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Desportos, Programa de Pós
Graduação em Educação Física, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Educação Física. 2. Fadiga. 3. Doença de
Parkinson. 4. Tetrahydrobiopterina. 5. Atividade
física. I. Latini, Alexandra Susana. II. Aguiar
Junior, Aderbal Silva . III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Educação Física. IV. Título.

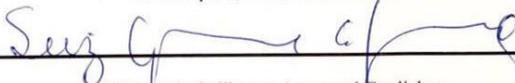
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE DESPORTOS**

A tese: METABOLISMO DAS PTERINAS E DA DOPAMINA EM
MECANISMOS DE NOCICEPÇÃO E FADIGA

Elaborada por: Débora da Luz Scheffer

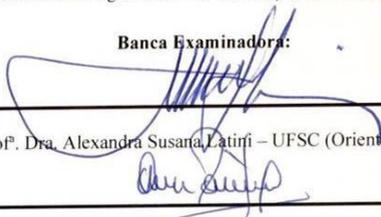
foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita junto ao
Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do título de **Doutor em
Educação Física**.

Florianópolis, 30 de maio de 2017

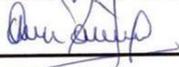


Prof. Dr. Luiz Guilherme Antonacci Guglielmo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Educação Física

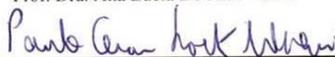
Banca Examinadora:



Prof. Dra. Alexandra Susana Catirí – UFSC (Orientadora)



Prof. Dra. Ana Lúcia De Paul - UNC



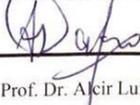
Prof. Dr. Paulo César Lock Silveira – UNESC



Prof. Dr. Ricardo Dantas de Lucas – UFSC



Prof. Dra. Manuella Pinto Kaster – UFSC



Prof. Dr. Aécio Luiz Dafre – UFSC

Dedico este trabalho a minha família,
meu maior tesouro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, meu bem mais precioso. Em especial aos meus pais, José Luiz e Ereni Maria, por todo ensinamento, dedicação e incentivo, além do amor e apoio incondicional que me fizeram concretizar mais esta etapa. Ao meu irmão Diogo, pelo carinho e amizade. Amo vocês!

Ao meu namorado, amigo e companheiro Rafael, obrigada por estar comigo em todos os momentos e por manter sempre meus pés no chão. Seu incentivo e compreensão me fazem uma pessoa muito melhor. Obrigada por fazer parte da minha vida.

À minha orientadora, Alexandra Latini, agradeço por todas as oportunidades e por toda confiança e incentivo. Você é uma excelente profissional que me inspira a ser sempre melhor. Obrigada por acreditar e apostar em mim.

Ao meu coorientador, Aderbal Silva Aguiar Jr. por todo apoio, ensinamento e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Rui Daniel Prediger e o Laboratório de Doenças Neurodegenerativas do Departamento de Farmacologia, obrigada pela colaboração.

À Prof^{ra}. Ana Lucia De Paul e ao Departamento de Microscopia Eletrônica da Universidad Nacional de Córdoba, obrigada pela colaboração.

Ao Prof. Clifford Woolf, do *Boston Children's Hospital do Harvard University*, Estados Unidos, por ter me recebido em seu laboratório e me proporcionado uma inesquecível experiência. Ao Prof. Nick Andrews, obrigada pela ajuda e ensinamentos que foram de grande importância para este trabalho.

À todos amigos de laboratório, os atuais e aos que já fizeram parte, obrigada por toda ajuda e incentivo. Guardarei para sempre uma ótima lembrança de todos.

Ao Prof. Anicleto Poli do Departamento de Farmacologia pela ajuda e ensinamento referentes ao HPLC.

Ao Programa de Pós-Graduação em Educação Física e aos seus secretários pela ajuda sempre que necessário.

A todos meus amigos e colegas ou aqueles que em algum momento me ajudaram e contribuíram para este trabalho e para minha formação, meu muito obrigada a todos de coração.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá, de alguma maneira, você chega lá”.

Ayrton Senna

RESUMO

As pterinas são uma classe de compostos heterocíclicos naturais. Dentre elas, está a 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4), cofator enzimático obrigatório para síntese de dopamina (DA), serotonina (5-HT) e óxido nítrico. As concentrações intracelulares da BH4 são mantidas por três vias metabólicas, sendo estas a síntese *de novo*, a via de reciclagem e a via de salvação. Este trabalho investigou a participação do metabolismo da BH4 e da DA na indução de fadiga e nos mecanismos de nocicepção sob condições inflamatórias. Inicialmente, investigou-se o efeito da desregulação dopaminérgica no desenvolvimento de fadiga e o efeito protetor da atividade física em camundongos Suíços adultos machos submetidos a um modelo experimental de doença de Parkinson (DP) pela administração repetida de reserpina (2 x 1mg/kg; i.p). Os sintomas de fadiga foram caracterizados pela redução na distância percorrida na roda de correr e no desempenho em um teste de esforço físico, sem demonstrar participação de fatores emocionais, nociceptivos ou metabólicos periféricos. A restituição das concentrações cerebrais de DA, induzida com a administração de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg; i.p), atenuou os sintomas de catalepsia e fadiga. Ainda, foi verificado que a reserpina (10µM) *per se* não comprometeu a viabilidade celular, liberação de lactato ou consumo de oxigênio mitocondrial em miotubos L6, indicando que os sintomas de fadiga parecem ser devidos exclusivamente ao prejuízo na neurotransmissão dopaminérgica, o que levaria a corroborar a fadiga como um sintoma não motor de origem central na DP. Posteriormente, investigou-se o efeito do tratamento com o inibidor da SR, SPRI3 (300 mg/kg; i.p.), sobre a nocicepção e liberação de biomarcadores em urina de camundongos Balb/c adultos machos submetidos a um modelo experimental de artrite reumatoide induzida pelo coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA; 1,5 mg/animal; i.p) e seguido da administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 50 µg/animal; i.p). O protocolo CAIA que corresponde a um modelo de dor crônica, caracterizou-se por duas fases, uma aguda inflamatória (entre os dias 4-25) e outra crônica de hipersensibilidade à dor (entre os dias 25-50). Observou-se que o inibidor SPRI3 reduziu a hipersensibilidade a dor térmica, a qual foi acompanhada de uma redução nas concentrações de BH4 e aumento de sepiapterina urinária em ambas as fases do modelo. Verificamos também que a sepiapterina só acumula quando o inibidor

está presente, mostrando a potencialidade desta pterina como biomarcador sensível de analgesia. Em adição, a inibição dos macrófagos por clodronate (0,84 mg/kg; i.p) no protocolo CAIA também reduziu a produção de BH4 e a hipersensibilidade a dor térmica, demonstrando a influência da ativação do sistema imune sobre a produção excessiva de BH4 e conseqüente potenciação do efeito álgico. Finalmente, investigou-se a produção de neopterinina urinária e a concentração dos neurotransmissores DA e 5-HT e seus metabólitos no estriado de camundongos C57BL/6 adultos machos submetidos a inflamação persistente por duas semanas através da infusão contínua de LPS (0,33 ou 0,83 mg/kg; bombas osmóticas) e a um protocolo de exercício físico moderado (três semanas em esteira; 5 sessões/semana de até 50 min/dia). Observou-se que o sistema dopaminérgico foi comprometido pelo estado inflamatório (LPS 0,33 mg/kg) e que o exercício físico preveniu o aumento na produção de neopterinina urinária e a redução da atividade do complexo I mitocondrial, induzido pela administração contínua de LPS (0,83 mg/kg), indicando assim, que o exercício físico de intensidade moderada, pode ser uma ferramenta valiosa para a prevenção dos efeitos causados por um estado inflamatório sustentado. Em conclusão, a farmacoterapia com L-DOPA e atividade física indicam ser tratamentos apropriados para combater os sintomas de fadiga presentes com uma alta prevalência em pacientes com DP, e as pterinas, neopterinina e sepiapterina, sensíveis biomarcadores para monitorar a ativação do sistema imune e a eficácia de um tratamento analgésico, respectivamente.

Palavras-chave: tetrahydrobiopterina, nocicepção, fadiga, atividade física, inflamação.

ABSTRACT

Pterines are a class of natural heterocyclic compounds. The pterin 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4) is an obligatory enzymatic cofactor for the synthesis of dopamine (DA), serotonin (5-HT) and nitric oxide. The intracellular concentrations of BH4 are maintained by three metabolic pathways, which are the *de novo* synthesis, the recycling and the salvage pathways. This study investigated the participation of BH4 metabolism and DA in the induction of fatigue and in the molecular mechanisms of nociception under inflammatory conditions. Initially, the effect of dopaminergic dysregulation on the development of fatigue and the protective effect of physical activity was investigated in adult male Swiss mice submitted to an experimental model of Parkinson disease (PD) by the repeated administration of reserpine (2 x 1mg/kg; i.p). The reserpine-induced model was characterized by the reduction in running wheel distance and performance in a physical effort test, pointing to the induction of fatigue. Additionally, this effect was independent of emotional, nociceptive or metabolic factors. Restoration of brain DA levels induced with L-DOPA/benserazide (100/50 mg/kg; i.p), attenuated the symptoms of catalepsy and fatigue. Furthermore, reserpine (10 μ M) *per se* did not compromise cell viability, lactate release or mitochondrial oxygen consumption in L6 myotubes. These data indicate that fatigue symptoms appear to be due exclusively to an impairment in the dopaminergic neurotransmission, corroborating fatigue as a central non-motor symptom in PD. Afterwards, the SR inhibitor effect (SPRi3; 300 mg/kg, ip) was investigated on nociception parameters and on the release of biomarkers in urine from male Balb/c mice submitted to an experimental model of rheumatoid arthritis induced by the anti-type II collagen antibody cocktail (CAIA, 1.5 mg/animal, ip) and followed by administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS; 50 μ g/animal; ip). The CAIA protocol, which corresponds to a chronic pain model, was characterized by two phases, an acute inflammatory phase (between days 4-25) and the chronic pain hypersensitivity phase (between days 25-50). It was observed that the SPRi3 inhibitor reduced the hypersensitivity to thermal pain, which was accompanied by a reduction in BH4 levels and increase of urinary sepiapterin in the both phases of the CAIA protocol. It was also verified that sepiapterin only accumulates when the inhibitor is present, showing the potentiality of this pterin as a sensitive biomarker of analgesia. In addition, macrophage inhibition by clodronate (0.84 mg/kg; ip) in the protocol also reduced BH4 production and heat pain hypersensitivity,

demonstrating the influence of immune system activation on the excessive production of BH₄ and consequent potentiation of algisia. Finally, we investigated the production of urinary neopterin and the levels of the neurotransmitters DA and 5-HT and their metabolites in the striatum of adult male C57BL/6 mice submitted to persistent inflammation for two weeks by continuous infusion of LPS (0.33 or 0.83 mg/kg, Alzet osmotic pumps) and to a moderate physical exercise protocol (treadmill for three weeks; 5 sessions/week; up to 50 min/day). It was observed that the dopaminergic system was compromised by the inflammatory state (LPS 0.33 mg/kg) and that exercise prevented the increase in the production of urinary neopterin and the reduction of mitochondrial complex I activity, induced by continuous administration of LPS (0.83 mg/kg), indicating that moderate intensity exercise can be a valuable tool for the prevention of the effects caused by a sustained inflammatory state. In conclusion, L-DOPA pharmacotherapy and physical activity indicated to be appropriated treatments to combat fatigue symptoms, highly prevalent in patients with PD, and the pterines, neopterin and sepiapterin sensitive biomarkers to monitor the activation of the immune system and the effectiveness of an analgesic treatment, respectively.

Keywords: tetrahydrobiopterin, nociception, fatigue, physical activity, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias metabólicas <i>de novo</i> , salvação e reciclagem envolvidas na produção de BH4.....	40
Figura 2	Via de salvação 1 e 2.....	42
Figura 3	Representação esquemática da biossíntese, vesicularização, liberação, transmissão, metabolismo e recaptção de dopamina.....	44
Figura 4	Distribuição de receptores dopaminérgicos no cérebro.....	46
Figura 5	Representação esquemática da classificação de fadiga subjetiva e fatigabilidade na doença de Parkinson.....	56
Figura 6	Representação esquemática da inibição do transportador vesicular de monoaminas pela reserpina.....	60
Figura 7	Rodas de correr empregadas no protocolo de atividade física.....	62
Figura 8	Cinética da L-DOPA, benserazida e dopamina no plasma e estriado de animais após a administração de L-DOPA/benserazida.....	71
Figura 9	Caracterização do modelo experimental da doença de Parkinson induzido por reserpina, e o efeito de L-DOPA/benserazida.....	73
Figura 10	Efeito da atividade física voluntária e da administração da combinação de L-DOPA/benserazida, sobre a rigidez muscular induzida pela administração de reserpina em animais expostos a rodas de correr.....	75
Figura 11	Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA, sobre o desempenho físico em animais submetidos a um teste de esforço máximo em esteira.....	77
Figura 12	Efeito da administração de reserpina sobre o conteúdo mitocondrial em músculo esquelético e estriado de animais submetidos a atividade física voluntária em roda de correr.....	79
Figura 13	Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA sobre o estado emocional e a nocicepção de	

	camundongos Suíços machos.....	80
Figura 14	Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA sobre o sistema cardiovascular de camundongos Suíços machos.....	81
Figura 15	Efeito da administração de reserpina <i>in vitro</i> sobre a viabilidade, metabolismo energético e respiração celular de miotubos L6.....	82
Figura 16	Representação esquemática da inibição da enzima SR pelo inibidor SPRi3.....	88
Figura 17	Representação esquemática da indução do modelo experimental de artrite reumatoide.....	90
Figura 18	Caracterização do modelo de artrite reumatoide induzido pela administração de um coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II em camundongos Balb/c adultos.....	94
Figura 19	Efeito do inibidor SPRi3 sobre a nocicepção na fase aguda do modelo CAIA.....	96
Figura 20	Efeito do inibidor SPRi3 sobre as concentrações de BH4 e sepiapterina urinária na fase aguda do modelo CAIA.....	97
Figura 21	Efeito e do inibidor SPRi3 sobre a nocicepção na fase crônica do modelo CAIA.....	98
Figura 22	Efeito do inibidor SPRi3 sobre as concentrações de BH4 e sepiapterina urinária na fase crônica do modelo CAIA.....	99
Figura 23	Perfil das concentrações de sepiapterina urinária durante as fases aguda e crônica do modelo CAIA..	100
Figura 24	Efeito do inibidor clodronate sobre a nocicepção e concentração de BH4 urinária no modelo CAIA.....	101
Figura 25	Representação esquemática da ativação do receptor do tipo <i>Toll</i> 4 pelo lipopolissacarídeo bacteriano.....	105
Figura 26	Produção de neopterinina urinária em camundongos C57BL/6 adultos submetidos a inflamação induzida por LPS.....	109
Figura 27	Concentração de aminas biogênicas em um estado inflamatório crônico induzido por LPS.....	110
Figura 28	Efeito da administração aguda de LPS sobre o desempenho físico.....	111

Figura 29 Efeito do exercício físico sobre a produção de neopterinina em camundongos C57BL/6 adultos submetidos a um estado inflamatório crônico induzido por LPS..... 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Escore utilizado para o teste de avaliação da postura cataléptica.....	64
Tabela 2	Escore utilizado para avaliar os sinais de artrite.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1'-Oxo-TP: 1'-hidroxi-2'-oxo tetrahydropterina ou 6-lactoilo tetrahydropterina
2'-Oxo-TP: 2'-Oxo-1'-hidroxipropiltetrahydrobiopterina
5-ASA: 5-aminosalicílico
5-HIAA: ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT: serotonina
AKR1C3: 3- α -hidroxiesteróide desidrogenase de tipo 2
AMPc: AMP cíclico
AR ou AKR1B1: aldose redutase
ATP: adenosina trifosfato
BH2: 7,8-dihidrobiopterina
BH4: tetrahydrobiopterina
BHE: barreira hematoencefálica
Bpm: batimentos cardíacos por minuto
CAIA: coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II
CR ou CBR1: carbonil redutase
DA: dopamina
DAHP: 2,4-diamino-6-hidroxipirimidine
DAMP: padrão molecular associado a perigo
DAT: transportador de dopamina plasmático
DDC: dopa-descarboxilase
DHFR: dihidrofolato redutase
DHPR: dihidropteridina redutase
DMARDs: Drogas Anti-Reumáticas Modificadoras de Doenças
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DP: doença de Parkinson
DTE: ditioeritritol
ECG: eletrocardiograma
EPM: erro padrão da média
ERN: espécie reativa de nitrogênio
ERO: espécie reativa de oxigênio
ETS: electron transport system (capacidade máxima de transferência de elétrons)
FC: frequência cardíaca
FCCP: carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
G_i: proteína G inibitória
GPe: globo pálido externo
GPi: globo pálido interno
G_s: proteína G estimulatória

GTP: guanosina trifosfato
GTPCH: GTP ciclohidrolase I
GTPCH: GTP ciclohidrolase I
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HPA: hiperfenilalaninemia
HPLC: cromatografia líquida de alta performance
HVA: ácido homovanílico
i.c.v: intracerebroventricular
i.p: intraperitoneal
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDO: indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN: interferon
IL: interleucina
L-DOPA: levodopa
LEAK: electron flow coupled to proton pumping to compensate for proton leaks (vazamento de protons)
LPS: lipopolissacarídeo bacteriano
MAMP: padrão molecular associado a microorganismo
MAO-B: monoamina oxidase-B
MET: equivalentes metabólico
MFI: Inventário Multidimensional de Fadiga (*Multidimensional Fatigue Inventory*)
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MTT: 3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NADH: dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NF-κB: fator nuclear κB
NGF: fator de crescimento do nervo
NMDA: N-metil-D-aspartato
NOS: óxido nítrico sintase
NST: núcleo subtalâmico
O₂⁻: superóxido
ON: óxido nítrico
ONOO⁻: peroxinitrito
PAMP: padrão molecular associado a patógeno
PTP: 6-piruvil tetrahidropterina
PTPS: 6-piruvil-tetrahidropterina sintase
ROX: residual oxygen consumption (consumo de oxigênio residual)
RR: recording rate (taxa de registro)
SFB: soro fetal bovino
SN: substância negra

SNC: sistema nervoso central
SNpc: substância negra parte compacta
SPRi3: inibidor da sepiapterina redutase 3
SR: seapterina redutase
SSZ: sulfasalazina
TLR: receptores do tipo *Toll*
TLR4: receptor do tipo *Toll* 4
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
TNF- β : fator de necrose tumoral beta
UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina
VMAT2: transportador vesicular de monoaminas
VO₂max: consumo máximo de oxigênio
VTA: área tegmentar ventral

Lista de publicações relacionadas à Tese:

SCHEFFER, D.L.; MARTINS, R.P.; DE PAUL, A.; TORRES, A.; PREDIGER, R.D.; WARD, C.; ANDREWS, N.; AGUIAR, A.S.JR.; LATINI, A. Levodopa improves performance fatigability in reserpine-treated mice. Submetido à Revista Neuron.

ANDREWS, N.; FUJITA, M.; **SCHEFFER, D.L.**; LATREMOLIERE, A.; COSTIGAN, M.; LATINI, A.; WOOLF, C.J. Sepiapterin reductase inhibition reduces inflammatory pain and reveals sepiapterin to be a pharmacological biomarker. Manuscrito elaborado e será submetido à Revista PAIN.

SCHEFFER, D.L.; GHISONI, K.; LATINI, A. Exercise prevents the increase of urinary neopterin lipopolysaccharide-induced. Manuscrito em elaboração e será submetido à Revista Inflammation.

Outras publicações durante o período do Doutorado:

ROSA JR, F.; FUENTES, J. P.; REMOR, A. P.; GHISONI, K.; SILVEIRA, P. C. L.; COSTA, V.; PRIM, R. L.; **SCHEFFER, D. L.**; AGUIAR, A.S.JR; GUGLIELMO, L.G.A.; LATINI, A. A tennis-based health program for middle-aged men who are at risk for heart disease. Integrative Obesity and Diabetes. v.3, p.1 - 6, 2017.

SOLANO, A. F.; **SCHEFFER, D. L.**; ALVES, A. C. B.; AGUIAR, A.S.JR; LATINI, A. Potential pitfalls when investigating the ergogenic effects of caffeine in mice. Journal of Systems and Integrative Neuroscience (JSIN). v.3, p.1 - 4, 2017.

LUCIANO, T. F.; MARQUES, S. O.; PIERI, B. L. S.; SOUZA, D. R.; ARAUJO, L. V.; NESI, R. T.; **SCHEFFER, D. L.**; COMIN, V. H.; PINHO, R. A.; MULLER, A. P.; SOUZA, C. T. Responses of skeletal muscle hypertrophy in Wistar rats to different resistance exercise models. PHYSIOLOGICAL RESEARCH. v.66, p.317 - 323, 2017.

GONÇALVES, RENATA; ZAMONER, ARIANE; ZANATTA, LEILA; ZANATTA, ANA PAULA; REMOR, ALINE PERTILE; **DA LUZ SCHEFFER, DÉBORA**; LATINI, Alexandra; SILVA, FÁTIMA REGINA MENA BARRETO. 1,25(OH)₂ vitamin D₃ signalling on immature rat Sertoli cells: gamma-glutamyl transpeptidase and glucose

metabolism. *Journal of Cell Communication and Signaling*. v.1, p.1 - 11, 2017.

SCHEFFER, D.L.; AGUIAR, A.S.JR.; LATINI, A. Fadiga na doença de Parkinson: implicações para a prática de atividade física. Artigo de revisão submetido à *Revista de Neurociências*, 2016.

SILVEIRA, PAULO C.L.; GLASER, V.; REMOR, A.; **SCHEFFER, D. L.**; AGUIAR, ADERBAL SILVA; PINHO, R. A.; LATINI, A. Low-level laser therapy attenuates the acute inflammatory response induced by muscle traumatic injury. *Free Radical Research*. v.50, p.1 - 11, 2016.

SILVA, L. A.; **SCHEFFER, D. L.**; ALVES, A.; PEREIRA, L. T.; MONERETTO, D. B.; TROMM, C.B.; Streck, Emilio L.; SILVEIRA, P. C. L.; PINHO, R. A. Effect of Aerobic Training of Moderate and Low Volume on Electron Transport Chain Activity and Oxidative Stress Markers in Skeletal Muscle. *Journal of Exercise Physiology Online*. v.18, p.81 - 93, 2015.

AGUIAR, ADERBAL SILVA; STRAGIER, EMILIEN; **DA LUZ SCHEFFER, DÉBORA**; REMOR, ALINE PERTILE; OLIVEIRA, PAULO ALEXANDRE; PREDIGER, RUI DANIEL; LATINI, Alexandra; RAISMAN-VOZARI, RITA; MONGEAU, RAYMOND; LANFUMEY, LAURENCE. Effects of exercise on mitochondrial function, neuroplasticity and anxio-depressive behavior of mice. *Neuroscience*. v.281, 2014.

SILVEIRA, PAULO CESAR LOCK; VICTOR, EDUARDO GHISI; NOTOYA, FREDERICO DE SOUZA; **SCHEFFER, DEBORA DA LUZ**; SILVA, LUCIANO DA; CANTÚ, ROBERTO BENAVIDES; MARTÍNEZ, VIRGINIA HIDOLINA COLLINS; DE PINHO, RICARDO AURINO; PAULA, MARCOS MARQUES DA SILVA. Effects of phonophoresis with gold nanoparticles on oxidative stress parameters in a traumatic muscle injury model. *Drug Delivery*. v.112, p.1 - 7, 2014.

SILVEIRA, P. C. L.; SILVA, L. A.; PINHO, C. A.; SOUZA, P. S.; RONSANI, M. M.; **SCHEFFER, D. L.**; PINHO, R. A. Effects of low-level laser therapy (Asga) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers in Medical Science*. v.28, p.431 - 436, 2013.

DE LUCAS, R.; CAPUTO, F.; SOUZA, K.M.; SIGWALT, A.R.; GHISONI, K.; SILVEIRA, P. C. L.; REMOR, A.; **SCHEFFER, D. L.**; GUGLIELMO, L.G.A.; LATINI, A. Increased platelet oxidative metabolism, blood oxidative stress and neopterin levels after ultra-endurance exercise. *Journal of Sports Sciences (Print)*. v.32 p.1 - 9, 2013.

MARTINS, R. P.; GLASER, V.; **SCHEFFER, D. L.**; FERREIRA, P. P.; WANNMACHER, C. M. D.; FARINA, M.; OLIVEIRA, P. A.; PREDIGER, R. D. S.; LATINI, A. Platelet oxygen consumption as a peripheral blood marker of brain energetics in a mouse model of severe neurotoxicity. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. v.45, p.449 - 57, 2013.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
2	ESTADO DA ARTE	34
2.1	INFLAMAÇÃO.....	34
2.2	NEOPTERINA.....	37
2.2.1	<i>Biossíntese de novo</i>	38
2.2.2	<i>Via de salvação</i>	41
2.2.3	<i>Via de reciclagem</i>	42
2.2.4	<i>BH4 e sistema dopaminérgico: relevância na doença de Parkinson</i>	43
2.2.5	<i>BH4 e algemia: relevância na artrite reumatoide</i>	49
2.2.6	<i>BH4 e analgesia: inibição da via de salvação</i>	51
2.3	PAPEL DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO NA ATIVIDADE FÍSICA E SAÚDE	52
2.3.1	<i>Fadiga na doença de Parkinson</i>	54
3	HIPÓTESE	58
4	OBJETIVOS	58
4.1	OBJETIVO GERAL.....	58
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
5	<u>CAPÍTULO I: PAPEL DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO NA FATIGABILIDADE EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR RESERPINA</u>	60
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	61
5.1.1	<i>Animais</i>	61
5.1.2	<i>Indução experimental da DP</i>	61
5.1.3	<i>Tratamento com fármacos</i>	61
5.1.4	<i>Protocolo de atividade física</i>	62
5.1.5	<i>Desenhos experimentais</i>	62
5.1.6	<i>Procedimentos e análises</i>	63
5.1.7	<i>Avaliações comportamentais</i>	63
5.1.8	<i>Mensurações bioquímicas</i>	66
5.1.9	<i>Parâmetro de ultraestrutura</i>	67
5.1.10	<i>Experimentos in vitro</i>	67
5.2	TRATAMENTO ESTATÍSTICO	69
5.3	RESULTADOS	70
5.3.1	<i>Curva de distribuição da L-DOPA, da benserazida, e a formação de dopamina no plasma e estriado de</i>	

	<i>camundongos Suíços machos.....</i>	70
5.3.2	<i>Caracterização do modelo de doença de Parkinson induzido pela administração repetida de reserpina em camundongos Suíços adultos.....</i>	72
5.3.3	<i>Efeito da atividade física voluntária e do tratamento farmacológico com L-DOPA, sobre a rigidez muscular induzida pela administração de reserpina no modelo experimental da doença de Parkinson.....</i>	74
5.3.4	<i>Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA, sobre o desempenho físico em animais submetidos a um teste de esforço máximo em esteira.....</i>	75
5.3.5	<i>Efeito da administração de reserpina sobre o conteúdo mitocondrial em músculo esquelético e estriado de animais submetidos a atividade física voluntária em roda de correr.....</i>	78
5.3.6	<i>Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA sobre o estado emocional e a nocicepção de camundongos Suíços machos.....</i>	80
5.3.7	<i>Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA sobre o sistema cardiovascular de camundongos Suíços machos.....</i>	81
5.3.8	<i>Efeito da administração de reserpina in vitro sobre a viabilidade, metabolismo energético e respiração celular de miotubos L6.....</i>	82
5.4	DISCUSSÃO.....	83
5.5	CONCLUSÃO.....	87
6	<u>CAPÍTULO II: PAPEL DA TETRAHIDROBIOPTERINA NOS MECANISMOS DE NOCICEPÇÃO EM MODELO ANIMAL DE ARTRITE REUMATOIDE.....</u>	88
6.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
6.1.1	<i>Animais.....</i>	89
6.1.2	<i>Modelo experimental de artrite reumatoide induzida por um coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA).....</i>	89
6.1.3	<i>Tratamento com o inibidor da sepiapterina redutase.....</i>	90
6.1.4	<i>Tratamento com o inibidor de macrófagos.....</i>	90
6.1.5	<i>Procedimentos e análises.....</i>	91

6.1.6	<i>Avaliações comportamentais.....</i>	91
6.1.7	<i>Coleta das amostras.....</i>	92
6.1.8	<i>Mensurações bioquímicas.....</i>	92
6.2	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	93
6.3	RESULTADOS.....	93
6.3.1	<i>Caracterização do modelo de artrite reumatoide induzido pela administração de um coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA) em camundongos Balb/c adultos.....</i>	93
6.3.2	<i>Efeito do inibidor SPRI3 sobre a nocicepção na fase aguda do modelo CAIA.....</i>	95
6.3.3	<i>Efeito do inibidor SPRI3 sobre as concentrações de BH4 e sepiapterina urinária na fase aguda do modelo CAIA.....</i>	96
6.3.4	<i>Efeito do inibidor SPRI3 sobre a nocicepção na fase crônica do modelo CAIA.....</i>	97
6.3.5	<i>Efeito do inibidor SPRI3 sobre as concentrações de BH4 e sepiapterina urinária na fase crônica do modelo CAIA.....</i>	98
6.3.6	<i>Perfil das concentrações de sepiapterina urinária durante as fases aguda e crônica do modelo CAIA....</i>	99
6.3.7	<i>Efeito do inibidor clodronate sobre a nocicepção e concentração de BH4 urinária no modelo CAIA.....</i>	100
6.4	DISCUSSÃO.....	102
6.5	CONCLUSÃO.....	104
7	<u>CAPÍTULO III: EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA PRODUÇÃO DE NEOPTERINA EM UM ESTADO INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO.....</u>	104
7.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	105
7.1.1	<i>Animais.....</i>	105
7.1.2	<i>Teste de carga incremental.....</i>	105
7.1.3	<i>Protocolo de exercício físico.....</i>	106
7.1.4	<i>Neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo bacteriano.....</i>	106
7.1.5	<i>Procedimentos e análises.....</i>	107
7.1.6	<i>Coleta amostras de urina.....</i>	107

7.1.7	<i>Mensurações bioquímicas.....</i>	107
7.2	TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	108
7.3	RESULTADOS.....	109
7.3.1	<i>Avaliação da produção de neopterinina urinária em camundongos C57BL/6 adultos submetidos a um estado inflamatório crônico induzido por LPS.....</i>	109
7.3.2	<i>Avaliação da concentração de aminas biogênicas em um estado inflamatório crônico induzido por LPS.....</i>	110
7.3.3	<i>Avaliação do efeito da administração aguda de LPS sobre o desempenho físico.....</i>	110
7.3.4	<i>Avaliação do efeito do exercício físico sobre a produção de neopterinina em camundongos C57BL/6 adultos submetidos a um estado inflamatório crônico induzido por LPS.....</i>	111
7.4	DISCUSSÃO.....	112
7.5	CONCLUSÃO.....	116
	REFERÊNCIAS.....	117

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é frequentemente caracterizado por um aumento na inflamação sistêmica (BRUUNSGAARD *et al.*, 2000; ERSHLER e KELLER, 2000) e está associado com um aumento progressivo na incidência de doenças crônicas. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), estima-se que em 2050, um quinto da população mundial será conformada por idosos (IBGE, 2010). O aumento do número de pessoas com mais de 60 anos representará, da mesma forma, um claro crescimento na prevalência de doenças relacionadas a um estado inflamatório crônico, dentre elas, as doenças inflamatórias auto-imunes, como a artrite reumatoide (LI *et al.*, 2016; WEYAND e GORONZY, 2016), e as doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP) (HIRSCH *et al.*, 2003; MATTSO e MAGNUS, 2006).

A inflamação é uma resposta protetora do organismo que visa eliminar patógenos ou moléculas causadoras de danos celulares e teciduais. A persistência e/ou desequilíbrio dessa resposta pode desencadear um estado de inflamação crônica, acarretando em um quadro prejudicial de dano tecidual (HSIEH e YANG, 2013). Neste sentido, o uso de biomarcadores periféricos auxilia a caracterizar precocemente, avaliar a progressão ou monitorar o tratamento paliativo em processos sistêmicos e/ou neurológicos (MOLERO-LUIS *et al.*, 2013b; WISSMANN *et al.*, 2013; SUH *et al.*, 2014).

A 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) é um cofator enzimático obrigatório para síntese de dopamina (DA), serotonina (5-HT) e óxido nítrico (ON) e parece ser de fundamental importância na fisiopatologia dessas doenças, principalmente por apresentar uma correlação positiva com os sintomas de dor (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). Ainda, a neopterinina, que é um subproduto da via de síntese *de novo* da BH4 e é sintetizada em condições de estresse celular induzido por estímulos inflamatórios (FRANSCINI *et al.*, 2003; ISHII *et al.*, 2005), tem sido relacionada com o desenvolvimento e progressão de doenças com comprometimento neurológico, como a DP (WIDNER, LEBLHUBER e FUCHS, 2002b).

Dessa forma, considerando a importância da molécula BH4 nos processos desencadeados por um estado inflamatório, buscou-se investigar por meio de modelo animal, o papel do metabolismo da BH4 nos mecanismos de nocicepção e fadiga, e as mudanças desse metabolismo com a atividade física.

Para uma melhor compreensão, esta Tese foi organizada em três capítulos: **Capítulo I:** Papel do sistema dopaminérgico na fadigabilidade em modelo animal de doença de Parkinson induzido por reserpina; **Capítulo II:** Papel da tetrahidrobiopterina nos mecanismos de nocicepção em modelo animal de artrite reumatoide, e **Capítulo III:** Efeito do exercício físico na produção de neopterinina em um estado inflamatório induzido por lipopolissacarídeo bacteriano.

2. ESTADO DA ARTE

2.1. INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica que ocorre em vários tipos de tecidos, e é direcionada para evitar lesões adicionais e/ou remoção das áreas danificadas, buscando promover a regeneração tecidual (HENEKA, KUMMER e LATZ, 2014). A manutenção da homeostasia do sistema nervoso central (SNC) é essencial para o funcionamento das células neurais. O processo inflamatório desempenha um papel crucial nesse processo de homeostase, principalmente através da defesa ativa contra diversos estímulos nocivos como infecções virais neurotrópicas e/ou danos traumáticos, promovendo o reestabelecimento da função celular e tecidual (BUTOVSKY *et al.*, 2006; DAS *et al.*, 2015).

O SNC desempenha estratégias para limitar a entrada de elementos imunes bem como a ativação imune tecidual, fenômeno chamado de privilégio imune. Tal condição é parcialmente dependente da presença e da integridade da barreira hematoencefálica (BHE), a qual limita a entrada de solutos e íons (CARSON *et al.*, 2006). Enquanto o acesso imune periférico para o SNC é restrito e finamente controlado, esse é capaz de gerar, de forma aguda ou crônica, respostas inflamatórias e imunes a vários estímulos nocivos, como por exemplo, infecções, trauma, derrame, toxinas e outros (XIONG *et al.*, 2009; FU *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014). Muitas doenças neurodegenerativas estão associadas com uma resposta inflamatória no SNC, conhecida como neuroinflamação, em que células gliais são ativadas (HALEY *et al.*, 2014). Células da microglia funcionam como células imunes do cérebro, monitorando continuamente o SNC para células danificadas, proteínas irregulares e agentes infecciosos. A ativação de células gliais leva a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), dando início a fagocitose e regulação positiva de mediadores pró-inflamatórios, os quais podem contribuir para o dano e morte neuronal (MATSUMURA e KOBAYASHI, 2004; SMITH *et al.*, 2012).

Um estímulo agudo pode promover estresse celular tipicamente de curta duração e se resolvido, não prejudica a sobrevivência neural. Assim, acredita-se que uma resposta neuroinflamatória aguda seja, de maneira geral, benéfica ao SNC, desde que ela tenda a minimizar o dano e contribuir para o reparo do tecido danificado (HSIEH e YANG, 2013). Quando a homeostasia do tecido nervoso não é restaurada após a resposta inflamatória aguda local, a neuroinflamação torna-se uma condição crônica, a qual pode levar a morte neuronal, representando um dos vários eventos patológicos induzidos por fatores pró-inflamatórios (HSIEH e YANG, 2013). Além de ativação persistente da microglia e subsequente liberação de mediadores inflamatórios, a neuroinflamação crônica também envolve o aumento do estresse oxidativo e/ou nitrosativo (TRONEL *et al.*, 2013; VASCONCELOS *et al.*, 2015). Na inflamação crônica, o processo normal de defesa e remoção de substâncias nocivas indesejadas torna-se desordenada e persiste mesmo na ausência de estímulos originais, no entanto, os mecanismos pelos quais a inflamação persiste por um longo tempo não são totalmente compreendidos. Durante o processo inflamatório crônico, as células saudáveis “vizinhas” sofrem danos colaterais como resultado do mau direcionamento do ataque do sistema imunológico (HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008; KRAMER e GENCO, 2017).

A liberação constante de mediadores inflamatórios propaga o ciclo inflamatório, ativando mais células microgliciais, promovendo sua proliferação e resultando na liberação de mais fatores inflamatórios. Devido a natureza crônica e persistente da inflamação, pode ocorrer o comprometimento da integridade da BHE, aumentando a permeabilidade da mesma com conseqüente infiltração de macrófagos periféricos no parênquima cerebral (YANG *et al.*, 2014; MAGGIOLI *et al.*, 2016). Uma vez no SNC, citocinas inflamatórias periféricas ou células do sistema imune podem dramaticamente influenciar na inflamação local e propagar a neuroinflamação ativando a produção local de citocinas (REYES e COE, 1996; ENGELHARDT, VAJKOCZY e WELLER, 2017; PRINZ e PRILLER, 2017). A partir desses pressupostos entende-se que a neuroinflamação tem conseqüências benéficas e deletérias, dependendo, criticamente, da resolução da resposta inflamatória.

As células microgliciais são macrófagos residentes no tecido nervoso e são as primeiras células a responderem a um estímulo nocivo. Desempenham papel crítico no reparo tecidual, regeneração neuronal, regulação do número de sinapses durante o desenvolvimento (WAKSELMAN *et al.*, 2008) e a remoção de neurônios apoptóticos

(TAKAHASHI, ROCHFORD e NEUMANN, 2005). A microglia pode ser ativada por estímulos agudos ou em estados crônicos como no envelhecimento e em doenças do SNC (MCGEER *et al.*, 1988), onde neurônios dopaminérgicos e colinérgicos estão entre as células mais suscetíveis aos efeitos deletérios da idade e estresses vindos do meio ambiente (SMITH *et al.*, 2012; AVENDANO *et al.*, 2014).

No seu estado ativado a microglia divide funções com macrófagos de outros tecidos, destruindo e fagocitando vírus, bactérias e outros invasores; possivelmente apresentando os antígenos para linfócitos infiltrados no tecido cerebral e removendo debris celulares como parte da restauração tecidual (KHOROOSHI e OWENS, 2010). Ainda, a microglia ativada também tem sido relacionada com comportamento do tipo doentio (*sickness behavior*), o qual provoca alterações comportamentais tais como fraqueza, apatia, mal-estar, anorexia, fadiga e alterações cognitivas e do humor (DANTZER *et al.*, 1998; POLAZZI e CONTESTABILE, 2002). A microglia pode modular a neuroinflamação, recuperar a homeostasia e proteger o tecido nervoso através da produção de citocinas anti-inflamatórias e fatores de reparo tecidual, como IFN do tipo 1α e 1β (PARK *et al.*, 2007; KHOROOSHI e OWENS, 2010). Entretanto, quando a neuroinflamação torna-se crônica e/ou sob estimulação secundária, a microglia produz quantidades excessivas de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL- 1β e IL-6, e ERO (GODBOUT *et al.*, 2005), exercendo efeitos deletérios e contribuindo para o desenvolvimento de doenças, como a DP (LAZZARINI *et al.*, 2013).

Os astrócitos também mantêm a homeostasia normal do tecido cerebral e exercem funções que auxiliam no desenvolvimento e migração de neurônios durante o desenvolvimento do SNC, produção de fatores de crescimento, manutenção da integridade da BHE e participação de respostas imune e de reparo (PEKKNY e PEKNA, 2014). Assim como a microglia, os astrócitos apresentam inúmeros receptores envolvidos na imunidade inata, incluindo os receptores do tipo *Toll* (TLRs) (BOWMAN *et al.*, 2003). Apesar de não serem consideradas células imunes, os astrócitos também possuem propriedades do tipo imune, como a expressão de citocinas (IL-1, IL-6, IL-10, IFN- α , IFN- β , TNF- α , TNF- β), quimiocinas (CHOI *et al.*, 2014) e fagocitose de debris celulares (BECHMANN e NITSCH, 1997).

As células com papel na resposta imune são ativadas pelo reconhecimento de estímulos nocivos ao tecido, os quais podem ser de origem patogênica ou do próprio hospedeiro. Os estímulos patogênicos

são estruturas microbianas conservadas, como lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), lipoproteínas, flagelina, peptidoglicano ou ácidos nucleicos bacteriano e viral. Essas estruturas são classificadas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a microorganismos (MAMPs) (POLTORAK *et al.*, 1998; OZINSKY *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2004). Quando invadem tecidos e/ou o sistema circulatório, os PAMPs/MAMPs podem iniciar uma resposta inflamatória mediada pelas células da imunidade inata, com consequente liberação de DAMPs (padrões moleculares associados a perigo). DAMPs são estímulos endógenos que podem ser células danificadas (debris) ou moléculas liberadas durante a morte celular como o ATP, que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a danos ou a estresse (PERREGAUX e GABEL, 1994). DAMPs podem agir sinergicamente com PAMPs/MAMPs e contribuir para o dano tecidual. Quando a resposta inflamatória é desencadeada exclusivamente pela presença de DAMPs, ela é denominada inflamação estéril, por não haver envolvimento de microorganismos (CODOLO *et al.*, 2013; HENEKA *et al.*, 2013).

Assim, a estimulação do sistema imune regula positivamente a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), um fator de transcrição que promove processos inflamatórios e de estresse oxidativo. Neste contexto, a ativação de células imunocompetentes induz a formação de IFN- α e IFN- β , potentes citocinas que consequentemente estimula a ativação de macrófagos. Esta ativação do sistema imune pode ser monitorada pela formação de neopterina, uma pteridina derivada de guanosina trifosfato (GTP) (WIDNER, LEBLHUBER e FUCHS, 2002b). Pacientes diagnosticados com DP apresentam altas concentrações de neopterina em fluídos biológicos (WIDNER, LEBLHUBER e FUCHS, 2002b), bem como, infiltração de linfócitos em tecido cerebral *post-mortem* (BROCHARD *et al.*, 2009). Ainda, evidências sugerem que a ativação de cascatas inflamatórias no SNC e periférico, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e persistência do estado de dor (KUPHAL, FIBUCH e TAYLOR, 2007; BENARROCH, 2008; YOON *et al.*, 2015).

2.2. NEOPTERINA

A neopterina é um subproduto da via de síntese *de novo* da 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH4) e é produzida principalmente por células do sistema imune, como monócitos e macrófagos, tendo como fator estimulante mais importante, as citocinas inflamatórias

(FRANSCINI *et al.*, 2003). O aumento das concentrações de neopterinina nos fluidos biológicos correlaciona-se positivamente com patologias associadas a processos inflamatórios e, por esta razão, atualmente é considerada um marcador sensível da ativação do sistema imune (FUCHS *et al.*, 1989b).

Assim como a neopterinina, a BH4 pertence a um grupo de compostos conhecidos como pteridinas. As pteridinas são uma classe de compostos heterocíclicos naturais amplamente distribuída pelos tecidos e descrita pela primeira vez por Gowland Hopkins em 1889 (HOPKINS, 1889).

BH4 atua biologicamente como cofator obrigatório para a atividade das enzimas fenilalanina hidroxilase, tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, as quais catalisam as etapas iniciais da degradação da fenilalanina no fígado, assim como as etapas iniciais limitantes da biossíntese dos neurotransmissores DA e 5-HT, respectivamente (KAUFMANN, 1963). A síntese de BH4 pode ser rapidamente induzida pela ativação de células neurais ou por células do sistema imune, por ser um dos cofatores obrigatórios para a atividade de todas as isoformas do óxido nítrico sintase (NOS), sendo essencial para a síntese de ON (MAYER, JOHN e BOHME, 1990; WERNER, WERNER-FELMAYER e MAYER, 1998).

Outra enzima dependente de BH4 é a alquilglicerol monooxigenase, uma proteína microsomal responsável pela clivagem catalítica de éteres lipídicos em glicerol por uma hidroxilação do átomo de carbono adjacente a ligação éter (TAGUCHI e ARMAREGO, 1998; WATSCHINGER *et al.*, 2009). Em condições fisiológicas, o metabolismo da BH4 é enzimaticamente regulado para manter o adequado balanço homeostático desta molécula.

As concentrações intracelulares da BH4 são mantidas por três vias metabólicas, sendo estas a síntese *de novo*, a via de reciclagem e a via de salvação.

2.2.1. Biossíntese de novo

A síntese *de novo* da BH4 inicia com a transformação de GTP em 7,8-diidroneopterinina trifosfato pela catálise enzimática da GTP ciclohidrolase I (GTPCH), enzima limitante da via (LEVINE *et al.*, 1990). A seguir, a 6-piruvil-tetrahidropterina sintase (PTPS) converte este intermediário metabólico em 6-piruvil-tetrahidropterina, para finalmente a seapterina redutase (SR) gerar BH4; Figura 1 (BRACHER *et al.*, 1998; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

A GTPCH é controlada transcricionalmente por estímulos inflamatórios, tais como LPS, IFN- γ , IL1- β (FRANSCINI *et al.*, 2003), TNF- α (D'SA *et al.*, 1996), fator de crescimento do nervo (NGF) (BAUER *et al.*, 2002), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (ISHII *et al.*, 2005), entre outros. Enquanto a atividade de GTPCH pode ser estimulada em até 100 vezes durante condições inflamatórias, a atividade de PTPS e SR encontra-se minimamente aumentada nas mesmas condições (KERLER *et al.*, 1989; WERNER *et al.*, 1990; WERNER-FELMAYER *et al.*, 1993a; KANEKO *et al.*, 2003). Assim, durante estados inflamatórios, a PTPS torna-se a enzima limitante na biossíntese *de novo* de BH₄ (WERNER *et al.*, 1990; WERNER-FELMAYER *et al.*, 1993b), especialmente em monócitos e macrófagos humanos, visto que essas células possuem baixa expressão de PTPS, e gera um pseudo bloqueio metabólico (WERNER *et al.*, 1990). Dessa forma, durante o estado inflamatório, a regulação positiva de GTPCH excede a de PTPS (a segunda etapa de síntese) gerando o acúmulo de 7,8-diidroneopterina trifosfato, que após desfosforilação é transformada de forma não enzimática em neopterina, Figura 1 (OTA *et al.*, 2007; CHITTIPROL *et al.*, 2010; HAGBERG *et al.*, 2010). Entretanto, a produção de biopterina (estado de máxima oxidação de BH₄) estará favorecida em monócitos e macrófagos murinos ou células neuronais humanas, as quais expressam PTPS em maior quantidade, onde baixas concentrações de neopterina serão acumuladas (WERNER-FELMAYER *et al.*, 1993b).

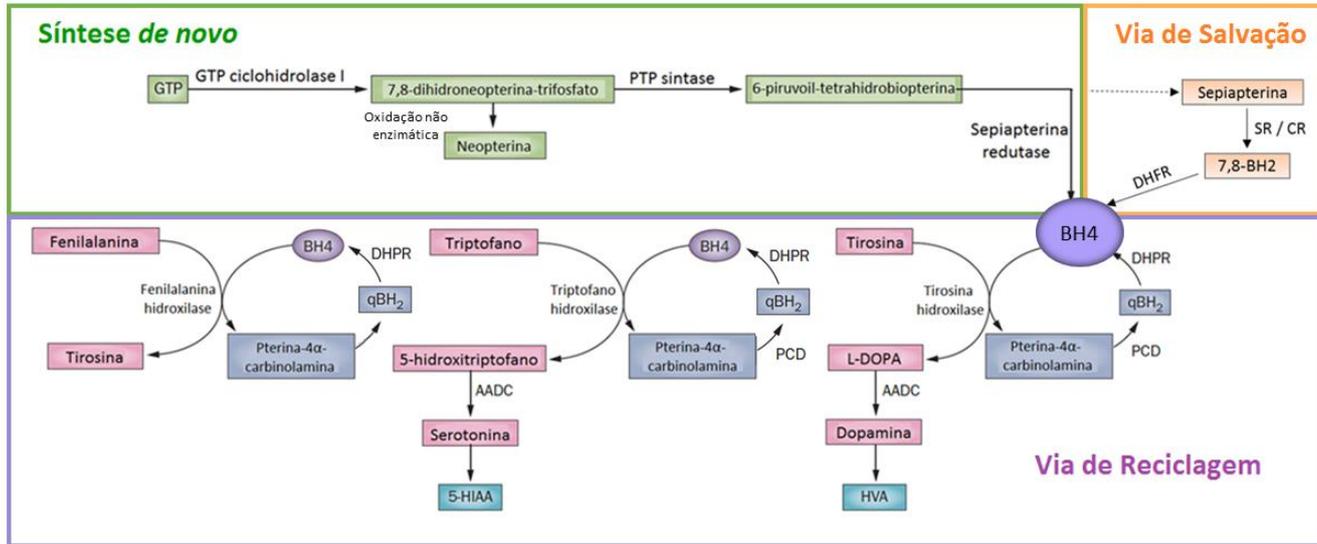


Figura 1: Vias metabólicas *de novo*, salvação e reciclagem envolvidas na produção de BH4. As concentrações intracelulares de BH4 são mantidas por três vias metabólicas, a via de síntese *de novo*, a via de salvação e a via de reciclagem. Abreviações: AADC, ácido L-amino descarboxilase aromático; BH4, tetrahydrobiopterina; CR, carbonil redutase; DHFR, dihidrofolato redutase; DHPR, dihidropteridina redutase; GTP, guanosina trifosfato; 5-HIAA, ácido 5-hidroxi-indolacético; HVA, ácido homovanílico; PCD, pterina-4α-carbinolamina; PTP, 6-piruvil tetrahydrobiopterina; qBH₂, quinoide dihydrobiopterina; SR, sepiapterina redutase. Adaptado de WIJEMANNE e JANKOVIC (2015).

2.2.2. Via de salvação

A enzima SR presente na síntese *de novo* de BH4, também pode participar na via de salvação, catalisando a conversão de sepiapterina em 7,8-dihidrobiopetrina (BH2), que então é transformada em BH4 pela dihidrofolato redutase (DHFR) (WERNER, BLAU e THONY, 2011), Figura 1. Embora a SR seja suficiente para completar a síntese de BH4, outras enzimas inespecíficas denominadas aldose redutases (AR ou AKR1B1) e carbonil redutases (CR ou CBR1) compartilham os mesmos substratos com SR e são capazes de catalisar as mesmas reações (PARK *et al.*, 1991). Assim, nesta via, a 6-piruvil tetrahydrobiopterina (PTP) pode ser transformada em intermediários instáveis (1'-hidroxi-2'-oxo tetrahydropterina (1'-Oxo-TP) ou também chamado de 6-lactoil tetrahydropterina) pelas AR/CR ou SR que favorecem *i*) a formação direta de BH4 ou *ii*) a formação não enzimática de sepiapterina, e desta em BH2 que será convertida em BH4 pela DHFR (BLAU, BONAFE e THONY, 2001; HIRAKAWA *et al.*, 2009; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). Dessa forma, a via de salvação pode sintetizar BH4 mesmo na ausência de atividade da enzima SR.

A deficiência de SR foi descoberta em pacientes com retardo psicomotor progressivo e distonia (BONAFE *et al.*, 2001). Estes pacientes apresentaram pterinas urinárias normais sem o aparecimento de hiperfenilalaninemia (HPA). Este achado sugeriu que uma ou mais enzimas poderiam estar envolvidas na conversão de PTP em BH4 mesmo na ausência de SR (BLAU, BONAFE e THONY, 2001). Este fato levou ao descobrimento desta *via de salvação*.

Blau e colaboradores (BLAU, BONAFE e THONY, 2001) propuseram que em caso de deficiência de SR a BH4 é sintetizada através da via de salvação pelas enzimas AR e CR (via de salvação 1). A atividade de DHFR é 10 vezes menor no cérebro quando comparado ao fígado (HIRAKAWA *et al.*, 2009). Então, a sepiapterina é reduzida para BH2 por CR, mas não seria reduzida para BH4 devido a baixa atividade de DHFR no cérebro. Dessa forma, eles concluíram que o paciente com deficiência de SR apresenta retardo psicomotor progressivo sem HPA (BLAU, BONAFE e THONY, 2001; HIRAKAWA *et al.*, 2009).

No entanto, Hirakawa e colaboradores sugeriram a existência de outra enzima CR que também estaria envolvida na formação de BH4. Aqui, a 3- α -hidroxiesteróide desidrogenase de tipo 2 (AKR1C3) catalisa a redução de PTP em 2'-Oxo-1'-hidroxipropiltetrahydrobiopterina (2'-Oxo-TP) que é reduzida a BH4 por AKR1B1 (HIRAKAWA *et al.*, 2009; WERNER, BLAU e THONY, 2011); Figura 2.

Estudos mostraram que animais *knockout* para a enzima SR apresentaram HPA, nanismo e deficiência nos movimentos do corpo, apesar de uma atividade normal de CR e DHFR no fígado. Dessa forma, a via de salvação 1 proposta por Blau e colaboradores parece não funcionar em fígado de camundongos, da mesma forma, acredita-se que a via de salvação 2 funcione em fígado humano, mas não em fígado de camundongos do tipo selvagem (*wild-type*) (BLAU, BONAFE e THONY, 2001; HIRAKAWA *et al.*, 2009). A presença da proteína AKR1C3 em fígado, mas não em cérebro de camundongos foi demonstrada por Western blot e imunohistoquímica e em contraste, a AKR1B1 foi detectada no cérebro, mas não no fígado. Ambas proteínas AKR1C3 e AKR1B1 foram expressas em fígado, no entanto, somente a AKR1B1 foi detectada no cérebro de humanos (HIRAKAWA *et al.*, 2009). Estes resultados explicam a relação entre HPA em animais *knockout* e a ausência de HPA em pacientes com deficiência de SR (BLAU, BONAFE e THONY, 2001; HIRAKAWA *et al.*, 2009).

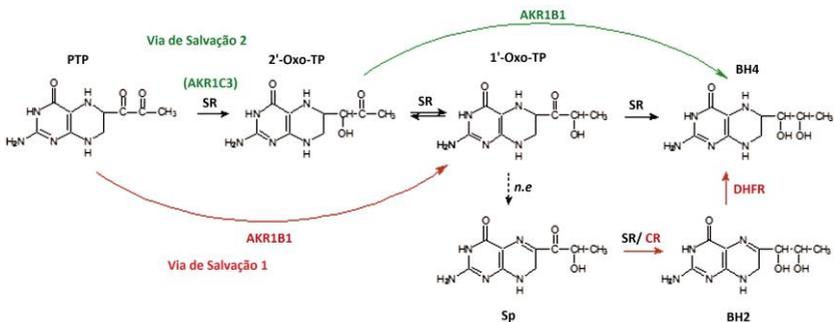


Figura 2: Via de salvação 1 e 2. A redução de 6-piruvil tetrahydrobiopterina (PTP) para BH4 é catalisada pela sepiapterina redutase (SR). Na ausência da atividade da SR duas vias alternativas têm sido propostas. Abreviações: AKR1B1, aldose redutase; AKR1C3, 3- α -hidroxioesteróide desidrogenase de tipo 2; BH2, dihydrobiopterina; BH4, tetrahydrobiopterina; DHFR, dihydrofolato redutase; 1'-Oxo-TP, 1'-hidroxi-2'-oxo tetrahydrobiopterina; 2'-Oxo-TP, 2'-Oxo-1'-hidroxipropiltetrahydrobiopterina; CR, carbonil redutase; Sp, sepiapterina. Adaptado de CARDUCCI *et al.* (2015).

2.2.3. Via de reciclagem

A terceira via que controla as concentrações intracelulares BH4 é a *via de reciclagem*. Aqui, a molécula de BH4 cede um par de elétrons para a hidroxilação de fenilalanina, tirosina e triptofano sendo oxidada em BH2, a qual é reciclada em BH4 a partir da enzima dihydropteridina

redutase (DHPR), Figura 1 (THONY, AUERBACH e BLAU, 2000; LONGO, 2009; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). Tirosina e triptofano, após hidroxilação, formam metabólitos estáveis como o ácido homovanílico (HVA) e o ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) que podem ser mensurados no líquido (LONGO, 2009). A via de reciclagem da BH4 acontece principalmente no fígado, devido a grande demanda de BH4 para a atividade da enzima fenilalanina hidroxilase, o que consequentemente acaba sendo importante para manter o conteúdo fisiológico de BH4 nos demais tecidos do organismo, em especial do cérebro (WERNER, BLAU e THONY, 2011).

Em uma condição de deficiência de BH4, a reação da NOS torna-se desacoplada e o superóxido (O_2^-) gerado, reage com o óxido nítrico (ON^*) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$) (COSENTINO *et al.*, 1998). O $ONOO^-$ pode induzir a apoptose das células neurais através da oxidação de lipídios, proteínas e DNA, e assim contribuir para os sintomas neurológicos (ZORZI, THONY e BLAU, 2002). Além disso, os metabólitos da BH4, BH2 e sepiapterina, inibem competitivamente a NOS, favorecendo o desacople (COSENTINO *et al.*, 1998; ZORZI, THONY e BLAU, 2002). Estes metabólitos acumulam no líquido de paciente com deficiência das enzimas DHPR e SR (HYLAND e HEALES, 1993; BONAFE *et al.*, 2001).

2.2.4. BH4 e sistema dopaminérgico: relevância na doença de Parkinson

A DA é um neurotransmissor monoaminérgico envolvido no controle do movimento e tem um papel importante no sistema de comportamento motivado a recompensa (THIERRY *et al.*, 1977; MORTENSEN e AMARA, 2003). Os neurônios da substância negra parte compacta (SNpc) sintetizam o neurotransmissor DA, responsável pela neurotransmissão entre SNpc e o corpo estriado, estrutura que controla funções motoras e motivacionais (CHEN, FURMAN e GNEGY, 2010). A síntese de DA ocorre a partir do aminoácido tirosina pela ação da enzima tirosina hidroxilase, na presença do cofator obrigatório BH4, para ser posteriormente armazenada em vesículas sinápticas (STAAL, MOSHAROV e SULZER, 2004). A vesicularização da DA ocorre através de um transporte ativo mediado pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) associado a uma bomba de prótons, enquanto que a recaptção da DA da fenda sináptica, é mediada através do transportador de dopamina plasmático (DAT;

Figura 3) (MORTENSEN e AMARA, 2003; CHAUDHRY, EDWARDS e FONNUM, 2008).

No entanto, a liberação de DA depende em parte do controle glutamatérgico, que pode ser comprometido por estresse oxidativo (FELGER e MILLER, 2012). Citocinas inflamatórias da periferia, ou produzidas localmente por microglia ativada ou por macrófagos infiltrados, podem produzir ON, bem como ácido quinolínico através de vias da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e quinurenina, ambas contribuindo para geração de ERO. A IDO é expressa em vários tipos de células, incluindo microglia e macrófagos, e pode ser ativada por citocinas (TAKIKAWA *et al.*, 1986; DAI e GUPTA, 1990). A ativação da IDO cataboliza o triptofano, precursor primário de aminoácidos da 5-HT, para a quinurenina, que então pode ser catabolizada nos metabólitos neuroativos, ácido quinurênico (nos astrócitos) e ácido quinolínico (na microglia) (BENDER, 1983). O ácido quinolínico também pode ativar diretamente o receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) para induzir a liberação de glutamato. Em contraste, o ácido quinurênico reduz a liberação de glutamato e demonstrou ser um antagonista de receptores de NMDA (FELGER e MILLER, 2012).

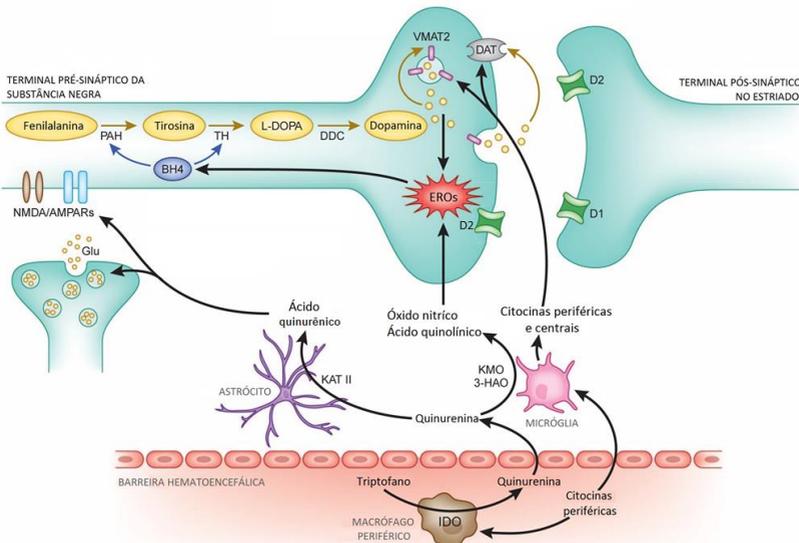


Figura 3: Representação esquemática da biossíntese, vesicularização, liberação, transmissão, metabolismo e recaptção de dopamina (DA). A síntese do neurotransmissor DA inicia a partir da transformação da tirosina em

L-DOPA pela ação da tirosina hidroxilase (TH), seguida da ação da dopa descarboxilase (DDC), para produzir a DA. A vesicularização da DA é realizada através do transportador vesicular de monoaminas (VMAT2), e a recaptação da DA da fenda sináptica, é feita pelo transportador de DA plasmático (DAT). Os receptores D1 e D2 medeiam a transmissão dopaminérgica. Adaptado de FELGER e MILLER (2012).

Os gânglios da base são um conjunto de estruturas cerebrais que controlam a atividade motora por meio da regulação de impulsos neuromotores, auxiliando na execução de movimentos sequenciados, como a marcha. Estas estruturas são constituídas pela SNpc, estriado, globo pálido externo (GPe) e interno (GPi) e núcleo subtalâmico (NST) (JENNER, 2008; BRICHTA, GREENGARD e FLAJOLET, 2013). Os gânglios da base auxiliam o córtex motor no controle de movimentos através de duas vias: a direta e a indireta. Essas duas vias têm funções distintas para o controle de movimentos. A via direta facilita a atividade motora, enquanto a via indireta inibe a atividade motora (FOLEY e FLESHNER, 2008; CHEN, FURMAN e GNEGY, 2010; GOETZ, 2011). A sinalização dopaminérgica ocorre através de cinco tipos de receptores dopaminérgicos que se encontram divididos em duas famílias: D1 (receptor excitatório presente na via direta) e D2 (receptor inibitório presente na via indireta). A família D1 compreende os subtipos D1 e D5, enquanto a família D2 compreende os subtipos D2, D3 e D4 (KEBABIAN e CALNE, 1979). As propriedades dos receptores de DA são classificadas de acordo com seu efeito sobre a formação de AMP cíclico (AMPc). A ativação dos receptores da família D1 leva a um aumento do AMPc, enquanto a ativação dos receptores da família D2 inibe a produção de AMPc. De fato, os receptores da família D1 estão associados a uma proteína G estimulatória (G_s), à abertura de canais iônicos de cálcio e a consequente despolarização da célula, levando à excitação neuronal e a propagação do impulso elétrico. Já os receptores da família D2 são considerados inibitórios, pois atuam hiperpolarizando o neurônio através de proteínas G inibitórias (G_i), e impedindo, conseqüentemente, a propagação do impulso (SIBLEY e MONSMA, 1992; BRICHTA, GREENGARD e FLAJOLET, 2013).

Os receptores dopaminérgicos podem ainda ser classificados como pré ou pós-sinápticos (SKIRBOLL, GRACE e BUNNEY, 1979). Os pré-sinápticos são da família D2 e atuam na regulação da liberação de DA para as células pós-sinápticas. A grande maioria encontra-se nos corpos celulares e dendritos da SNpc e da área tegmentar ventral (VTA), Figura 4. Essas estruturas contêm neurônios dopaminérgicos e são as

principais responsáveis pela produção e liberação de DA para outras estruturas encefálicas (VUCKOVIC *et al.*, 2010; BEAULIEU e GAINETDINOV, 2011). Os receptores pós-sinápticos, por sua vez, podem ser da família D1 ou D2. Os receptores dopaminérgicos das famílias D1 e D2 encontram-se distribuídos em diferentes quantidades nas diferentes regiões anatômicas do SNC (PERREAULT *et al.*, 2011). O estriado apresenta alta expressão de ambos os receptores. Na maioria das regiões neocorticais a expressão de D1 é elevada, com baixa expressão de D2. No tálamo, hipocampo e no tronco encefálico encontram-se principalmente receptores da família D2. Há, no entanto, pouca evidência de expressão de D1 nessas regiões (WEINER *et al.*, 1991; HURD, SUZUKI e SEDVALL, 2001).

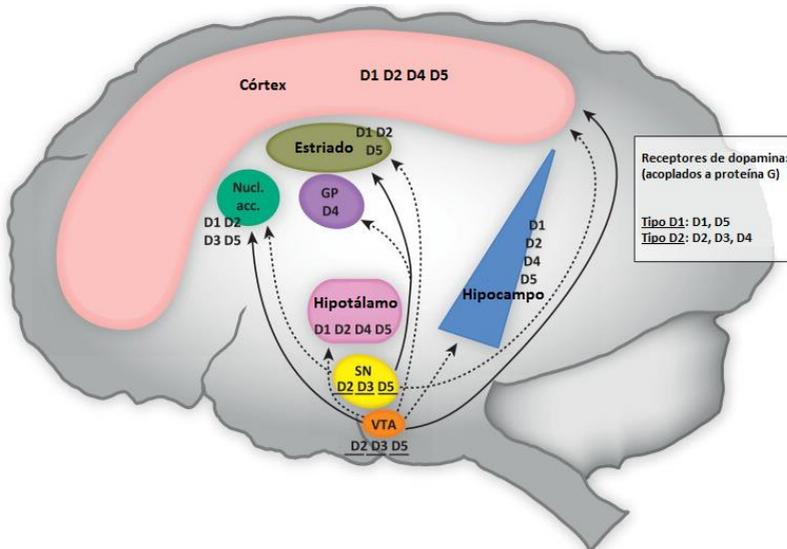


Figura 4: Distribuição de receptores dopaminérgicos no cérebro. Os receptores dopaminérgicos são classificados em dois tipos: D1 e D2. A família D1 compreende os subtipos D1 e D5, e a família D2 compreende os subtipos D2, D3 e D4. Abreviações: Nucl. acc., núcleo accumbens; SN, substância negra; VTA, área tegmental ventral. Adaptado de BRICHTA, GREENGARD e FLAJOLET (2013).

No entanto, o mau funcionamento dos gânglios da base dá origem à alterações motoras descritas na DP, caracterizada como uma doença neurodegenerativa progressiva crônica (BURCH e SHEERIN, 2005). A DP afeta aproximadamente 1% da população acima de 60 anos

e é a segunda doença neurodegenerativa mais comum. A prevalência mundial da DP é de 100 a 200 casos a cada 100.000 habitantes (DE LAU; BRETELER, 2006). A DP se caracteriza histopatologicamente pela perda seletiva de neurônios dopaminérgicos da SNpc do mesencéfalo e por inclusões intracitoplasmáticas conhecidas como corpúsculos de Lewy, as que são constituídas principalmente pelas proteínas α -sinucleína e ubiquitina (BERNHEIMER *et al.*, 1973; SPILLANTINI *et al.*, 1997; ALVES *et al.*, 2008). Os corpúsculos de Lewy são inclusões intracelulares de origem proteica que se acumulam em neurônios em processo de degeneração, especialmente nos neurônios dopaminérgicos da SNpc. A fisiopatologia da DP está associada a disfunção dos sistemas neurotransmissores, principalmente por uma redução nas concentrações de DA no corpo estriado (BURCH e SHEERIN, 2005).

Os principais sintomas da DP relacionam-se com as características motoras, e incluem: tremor em repouso (4-6 Hz), dificuldade em iniciar o movimento (acinesia), redução da velocidade do movimento (bradicinesia), passos assimétricos no tamanho e na velocidade (hipocinesia), rigidez muscular, alterações de equilíbrio e instabilidade postural (MARSDEN, 1994; ANTONINI *et al.*, 1998; BERARDELLI *et al.*, 2001; GOETZ, 2011). Os pacientes diagnosticados com DP também apresentam manifestações não motoras que incluem depressão (WARBURTON, 1967), fadiga (FRIEDMAN *et al.*, 2007), distúrbios do sono REM (ZHANG, XU e LIU, 2017), constipação (SU *et al.*, 2017), alucinações, demência e dor, as quais impactam negativamente sobre a qualidade de vida (BOREK, AMICK e FRIEDMAN, 2006; CHAUDHURI e NAIDU, 2008; CHAUDHURI *et al.*, 2011; METTA *et al.*, 2011)

Na década de 60, após a identificação de alterações patológicas e bioquímicas no cérebro *post-mortem* de pacientes com DP, surgiu o primeiro tratamento de sucesso, abrindo caminho para o desenvolvimento de novas terapias mais efetivas (ONUAGULUCHI, 1968). A introdução de levodopa (L-DOPA) representou o maior avanço terapêutico na DP, produzindo benefícios clínicos para praticamente todos os pacientes e reduzindo a mortalidade por esta doença (LANG, 2009; OLANOW, STERN e SETHI, 2009). Além de aumentar a expectativa de vida, a terapia com L-DOPA está disponível a um baixo custo, e é geralmente bem tolerada (GAINES e HINSON, 2012). O tratamento farmacológico com L-DOPA tem a capacidade, depois de ser absorvido pelo trato gastrointestinal, de permear a BHE, ser captado pelo transportador de aminoácido aromático e transformado em DA no

terminal neuronal (YOUJIM, EDMONDSON e TIPTON, 2006). A farmacocinética da L-DOPA descreve uma meia vida plasmática de aproximadamente duas horas. Apenas 1-3% de uma dose de L-DOPA oral chega efetivamente ao cérebro, o restante é metabolizado periféricamente. Desta forma, é necessária a administração conjunta de inibidores da enzima dopa-descarboxilase (DDC) que promove a descarboxilação da DA, por exemplo, benserazida ou carbidopa (KALINDERI *et al.*, 2011). Estes inibidores não atravessam a BHE, aumentando a conversão central de L-DOPA. Embora a L-DOPA seja o medicamento de eleição para o tratamento da DP, a administração crônica do fármaco é frequentemente associada com o desenvolvimento de flutuações motoras e discinesias, que atingem aproximadamente 50% dos pacientes (normalmente após 3-5 anos) (LINAZASORO, 2005; KALINDERI *et al.*, 2011). “Flutuações motoras” se referem a respostas motoras flutuantes à administração da L-DOPA, com encurtamento da duração de seu efeito (fenômeno do *wearing off*) e interrupção súbita de sua ação, levando a uma situação “resposta-falta de resposta” (fenômeno *on-off*) ao medicamento (KOLLER, 2002).

Mutações genéticas nas enzimas que participam do metabolismo da BH4 também podem causar alterações motoras como distonia e tremores (NAGATSU e ICHINOSE, 1996; FURUKAWA *et al.*, 1998) devido a uma diminuição na concentração de aminas biogênicas (THONY e BLAU, 2006). A deficiência de DA, 5-HT, e/ou norepinefrina e as altas concentrações de fenilalanina no cérebro durante o desenvolvimento são os responsáveis de distúrbios cognitivos como retardo mental (NEVILLE *et al.*, 2005; LONGO, 2009). Ainda, em uma condição inflamatória, citocinas podem comprometer potencialmente diversos aspectos da neurotransmissão dopaminérgica, levando a uma *i*) diminuição da síntese de DA, *ii*) armazenamento ou liberação do neurotransmissor prejudicados, *iii*) ou a um aumento da receptação de DA; todos os quais podem interagir em maior ou menor grau para reduzir a função da DA nos gânglios da base (CADET e BRANNOCK, 1998; BEHAN *et al.*, 1999; FELGER e MILLER, 2012). Embora a inflamação e as citocinas tenham demonstrado induzirem a GTPCH, a produção de ERO e o aumento na atividade de NOS, podem, conseqüentemente, levar a uma diminuição da disponibilidade de BH4 e uma possível redução na síntese de DA (XIA *et al.*, 1998; CUNNINGTON e CHANNON, 2010; FELGER e MILLER, 2012).

2.2.5. BH4 e algia: relevância na artrite reumatoide

A relação entre o desenvolvimento da dor inflamatória e neuropática com um aumento na produção de BH4 tem sido demonstrada pelo nosso grupo de pesquisa (TEGEDER *et al.*, 2006; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). A dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desconfortável associada com dano tecidual atual ou potencial (WOOLF, 2010). A detecção de estímulos nocivos que provocam dor, sejam estes químicos, mecânicos ou térmicos, é mediada por receptores especializados presentes em neurônios sensoriais ou nociceptores (LEE, LEE e OH, 2005). Os nociceptores são terminações nervosas responsáveis pela percepção da dor e estão ligados a fibras dos nervos periféricos do tipo A δ e C (COLLOCA *et al.*, 2017). Estas terminações podem ser alteradas por mudanças neurais ou inflamatórias, tendo seu sinal amplificado ou inibido. As fibras A δ são mielinizadas e em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de forma rápida, ao contrário, as fibras C, que não são mielinizadas, são responsáveis pela transmissão lenta da dor. A percepção dolorosa é frequentemente desencadeada por estímulo nocivo, seja uma lesão ou uma doença em tecido somático ou nervoso, periférico ou central (WOOLF, SHORTLAND e COGGESHALL, 1992; COLLOCA *et al.*, 2017).

Os nociceptores são encontrados nos tecidos superficiais, profundos e vísceras e sua principal característica é o alto limiar de excitabilidade. Quando um estímulo mecânico, térmico, ou químico intenso, é aplicado ao organismo, os nociceptores são ativados e uma informação é encaminhada ao SNC (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010). Existem três classes de nociceptores, os mecanociceptores, que são sensíveis a estímulos mecânicos, os termociceptores, sensíveis a estímulos térmicos, e os nociceptores polimodais, que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (WOOLF, 2010). Os nociceptores sensoriais podem ser sensibilizados por inflamação prolongada, ou injúria no axônio (nervo), provocando sensações dolorosas anormais, como hiperalgia ou alodinia, no local da lesão e no tecido normal adjacente (WOOLF e SALTER, 2000). Hiperalgia caracteriza-se por sensibilidade aumentada à dor, e alodinia pela percepção de dor em resposta a estímulos não dolorosos (LOESER e TREEDE, 2008; KWON *et al.*, 2014).

A dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda se manifesta transitoriamente por um curto período e na maioria das vezes com causas facilmente identificáveis. Funciona como um

alerta do corpo para lesões em tecidos, inflamações ou doenças (WOOLF, 1991). Os estados de dor crônica diferenciam-se das condições de dor aguda, devido ao fato de se desenvolver por uma disfunção ou dano ao SNC ou periférico (MANSOUR *et al.*, 2014), sendo constante e intermitente e podendo persistir por dias, meses, ou até anos. Quase sempre está associada a um processo de doença crônica (ZIMMERMANN, 2001; LOESER e TREEDE, 2008; SOMERS e CLEMENTE, 2009).

A dor também pode ser classificada como nociceptiva, inflamatória ou neuropática (WOOLF, 2010). A dor nociceptiva é desencadeada por uma lesão em tecidos periféricos, como tecidos ósseos, musculares ou ligamentares, em que ocorre a ativação de nociceptores sem prejuízo ao SNC, sendo ativada somente na presença de um estímulo intenso (WOOLF, 2010). O segundo tipo de dor é causado pela ativação do sistema imunológico, podendo ser ocasionado por lesão tecidual ou infecção e, portanto, chamada de dor inflamatória (WALSH e MCWILLIAMS, 2014). Já a dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema somatosensorial, que inclui fibras periféricas e SNC; para revisão ver LATREMOLIERE e WOOLF (2009).

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória que tem como um dos principais sintomas a dor (HEIBERG e KVIEN, 2002). A artrite reumatoide afeta aproximadamente 1% da população adulta mundial e determina um custo social e econômico importante, considerando o grau de incapacidade para o trabalho e também o aumento na mortalidade decorrente desta doença (VOLLERTSEN *et al.*, 1986; SUZUKI *et al.*, 1994; KHACHIGIAN, 2006).

A artrite reumatoide é caracterizada por um processo inflamatório multicelular localizado nas articulações, incluindo a infiltração de linfócitos e granulócitos na cartilagem articular, proliferação de fibroblastos sinoviais, células B, macrófagos e neovascularização do revestimento sinovial das articulações (WALSH e MCWILLIAMS, 2014). O processo inflamatório é mediado por citocinas inflamatórias, interleucinas e TNF, que são encontrados em grande quantidade no líquido sinovial das articulações inflamadas, tendo suas concentrações sistêmicas também aumentados (EASTGATE *et al.*, 1988; WESTACOTT *et al.*, 1990; DELEURAN *et al.*, 1992). Este processo de proliferação não só conduz ao derrame articular (inchaço) como também a dor em múltiplas articulações, a qual pode progredir para destruição da articulação, provocando a perda de densidade óssea (NANDAKUMAR e HOLMDAHL, 2006). A dor é um problema

significativo durante a fase aguda da doença, mas estudos tem demonstrado que a dor continua a persistir para muitos pacientes com artrite crônica (WOLFE e MICHAUD, 2007; TAYLOR *et al.*, 2010). Isto indica que não é apenas a inflamação, mas também fatores adicionais que contribuem para a persistência da dor na artrite reumatoide (BAS *et al.*, 2012).

Dessa forma, muitas pesquisas concentram-se na busca por compostos que possam causar analgesia (TEGEDER *et al.*, 2006; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015), a qual é definida pela ausência de dor em resposta a um estímulo que normalmente seria doloroso (WALSH e MCWILLIAMS, 2014). Nesse sentido, tem-se dado grande importância na participação do metabolismo da BH4 nos processos relacionados a dor (TEGEDER *et al.*, 2006; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

2.2.6. BH4 e analgesia: inibição da via de salvação

Como mencionado previamente, nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente o envolvimento da BH4 nos processos de nocicepção (TEGEDER *et al.*, 2006; COSTIGAN, LATREMOLIERE e WOOLF, 2012; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). A existência de um polimorfismo em seres humanos, o qual regula a enzima GTPCH em resposta a dor crônica foi demonstrado por LOTSCH *et al.* (2007). O efeito deste haplótipo é dependente do tipo de dor. Por exemplo, a dor nociceptiva é menos alterada do que a dor inflamatória, sendo a dor neuropática a mais afetada. De acordo com Tegeder e colaboradores (2006) e Latremolier *et al.* (2015), ratos e camundongos acometidos por inflamação e injúria do nervo ciático, apresentam um aumento na síntese de BH4 em neurônios sensoriais. Dessa forma, foi proposto que a inibição da produção de BH4 teria efeitos analgésicos.

A descoberta dos efeitos moleculares da sulfasalazina (SSZ) por Chidley e colaboradores, levantou a possibilidade que a ação terapêutica da SSZ seria mediada em parte através da inibição da produção de BH4, e induziria também analgesia (CHIDLEY *et al.*, 2011; HARUKI *et al.*, 2013; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). A SSZ é um composto que pertence a uma classe de drogas descritas como Drogas Anti-Reumáticas Modificadoras de Doenças (DMARDs). A SSZ foi descoberta na década de 1950, sendo seu uso aprovado para as doenças inflamatórias como artrite reumatoide e colite ulcerativa (HUBER *et al.*, 1984). A SSZ é incompletamente absorvida a partir do intestino delgado e transportada para o cólon onde é reduzida por bactérias a sufapiridina e mesalazina ou 5-aminosalicílico (5-ASA) (CAPRILLI *et*

al., 2009). Inicialmente acreditou-se que a ação anti-inflamatória da SSZ era através da inibição de NF-kB, entretanto, mais recentemente mostrou-se que SSZ inibe a atividade da enzima SR (TAKAZAWA *et al.*, 2008; CHIDLEY *et al.*, 2011; O'DELL *et al.*, 2013).

Considerando que a SSZ não apresenta uma boa absorção no trato gastrointestinal, um novo inibidor da SR considerado mais potente, foi desenvolvido e denominado de inibidor da sepiapterina redutase 3 (SPRi3) (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). O efeito *in vivo* em roedores da inibição da SR pelo SPRi3 foi recentemente publicado pelo nosso grupo de pesquisa em colaboração com a Harvard Medical School, demonstrando que o bloqueio na síntese de BH4 reduz a inflamação, e a hipersensibilidade a dor, além de reduzir as concentrações intracelulares de BH4 e de aumentar as de sepiapterina em plasma e nervo ciático, sem comprometer o sistema monoaminérgico (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

Com a inibição da via de salvação pelo SPRi3 o precursor metabólico sepiapterina é acumulado nos tecidos e posteriormente secretado (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). A aparição da sepiapterina nos fluídos biológicos dos roedores, poderia transformar este metabólito num biomarcador muito sensível de eficácia de tratamento na prática clínica, principalmente nos pacientes acometidos por dor crônica. Em pacientes com deficiência de SR, altas concentrações do metabólito sepiapterina são detectados no fluido cerebroventricular (HARUKI *et al.*, 2013) e dados do nosso grupo, indica que de fato este metabólito acumula somente quando SR é bloqueada (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

Assim, a identificação de biomarcadores que permitem o seguimento de um determinado tratamento farmacológico podem se tornar ferramentas muito poderosas que certamente impactarão na eficiência clínica, permitindo avaliar objetivamente a eficácia de um tratamento particular. O uso de biomarcadores também pode ajudar a identificar os indivíduos não-responsivos, evitando assim tratamentos desnecessários. A partir disso, está claro que a via(s) envolvidas no metabolismo da BH4 representam uma excelente oportunidade para usar biomarcadores para avaliar inibidores de SR, tal como SSZ e SPRi3, no tratamento de doenças inflamatórias.

2.3. PAPEL DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO NA ATIVIDADE FÍSICA E SAÚDE

Atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em gasto energético

maior do que o de repouso, ou seja, são movimentos básicos executados no nosso dia a dia como, por exemplo, andar, descer e subir escadas, correr para pegar o ônibus, execução de tarefas domésticas, entre outros. Já o exercício, é a forma planejada, estruturada, repetitiva e intencional da atividade física que possui o objetivo de melhora ou manutenção de um ou mais componentes da aptidão física e desempenho esportivo (CASPERSEN, POWELL e CHRISTENSON, 1985; GARBER *et al.*, 2011).

O custo energético de uma atividade/exercício, pode ser mensurado em METs (que significa equivalentes metabólicos) ou kcal/kg/min (GARBER *et al.*, 2011). O MET é uma unidade usada para estimar o custo metabólico (gasto de energia), onde 1 MET é a quantidade de oxigênio consumida em repouso ($3,5 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). O MET pode ser utilizado para classificar a intensidade do exercício, podendo ser de intensidade leve ($\pm 2,5$ METs), moderada (3 a 6 METs) ou intensa ($\geq 6,5$ METs) (MILES, 2007). Outra maneira de expressar a intensidade da atividade física e/ou exercício é associada ao consumo máximo de oxigênio (VO_2max) entretanto, na prática, a frequência cardíaca (FC) pode ser utilizada para refletir o efeito no consumo de oxigênio por serem parâmetros correlacionados (GARBER *et al.*, 2011).

A atividade física e o exercício regular, estão associados com numerosos benefícios para saúde física e mental em homens e mulheres, como diminuição da pressão arterial (RAITAKARI *et al.*, 1997), aumento da sensibilidade a insulina (GARBER *et al.*, 2011), controle de peso (MORA *et al.*, 2006), preservação da massa óssea (NELSON *et al.*, 2007), bem como, a prevenção e melhora de transtornos depressivos (LAWLOR e HOPKER, 2001), e de ansiedade (BIBEAU *et al.*, 2010) e um menor risco de disfunções cognitivas e demência (WIPFLI *et al.*, 2011). Para tais benefícios, recomenda-se realizar entre 150 a 300 min/semana de atividade física moderada ou 75 a 150 min/semana de atividade física intensa (GARBER *et al.*, 2011).

Em contra partida, o estilo de vida sedentário tem sido apontado como um fator de risco para o desenvolvimento de inúmeras doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes tipo 2 (HAMILTON, HAMILTON e ZDERIC, 2007; HANDSCHIN e SPIEGELMAN, 2008; DUNSTAN *et al.*, 2010; GRONTVED e HU, 2011).

Em trabalho publicado recentemente por Friend e colaboradores (2016), os autores demonstraram por meio de modelo animal, que uma dieta rica em gordura prejudica a sinalização dopaminérgica e pode

contribuir para a inatividade física na obesidade, assim eles propõem que a inatividade física parece ser a consequência e não a causa de obesidade (FRIEND *et al.*, 2017). Neste cenário, pode se sugerir que o comprometimento dopaminérgico, cria uma barreira para a realização de atividades físicas, estando diretamente relacionado a um estilo de vida sedentário, além de uma capacidade diminuída para exercício e, portanto, um baixo condicionamento físico (ELBERS *et al.*, 2009; FRIEDMAN, 2009; ARCHER, FREDRIKSSON e JOHANSSON, 2011).

Na DP, o comprometimento do sistema dopaminérgico com consequente diminuição nas concentrações de DA estriatais, é responsável por desencadear as alterações de movimento e as disfunções motoras (BURCH e SHEERIN, 2005). No entanto, não são apenas os sintomas motores que prejudicam a prática de atividade física/exercício físico em pacientes com DP. Sintomas não motores também podem influenciar negativamente para a realização de atividade física (CHAUDHURI, HEALY e SCHAPIRA, 2006). Dentre os sintomas não motores, as queixas de fadiga se destacam pela alta prevalência superior à 58%, sendo referida como um dos piores sintomas devido à influência negativa na independência funcional e qualidade de vida dos pacientes (FRIEDMAN *et al.*, 2007; LOU, 2009; CHAUDHURI *et al.*, 2011). Essa queixa é universal em doenças crônicas e progressivas, como por exemplo, no câncer, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, doença pulmonar obstrutiva crônica, entre outras (CHAUDHURI e BEHAN, 2004; FRIEDMAN, 2009; KLUGER, KRUPP e ENOKA, 2013).

Embora a fadiga periférica na DP tenha sido estudada por muitos pesquisadores (HOFF *et al.*, 1997; ZIV *et al.*, 1998; GARBER e FRIEDMAN, 2003; LOU *et al.*, 2003b; ELBERS *et al.*, 2009), até o presente momento não são encontrados estudos sobre a fadiga de origem central, sequer estudos sobre sua modulação com a prática de atividade física na DP.

2.3.1. Fadiga na doença de Parkinson

A fadiga é um sintoma comum e debilitante em muitas doenças crônicas, (CHAUDHURI e BEHAN, 2004) sendo caracterizada pela dificuldade na iniciação e sustentação de tarefas físicas e mentais (FABBRINI *et al.*, 2012). A fadiga na DP pode ser identificada desde os primeiros sintomas não motores da doença, geralmente antes do diagnóstico clínico ser realizado. Na maioria dos casos, a fadiga está associada a outras co-morbidades, como depressão e distúrbios do sono,

o que dificulta seu diagnóstico clínico (BOREK, AMICK e FRIEDMAN, 2006).

Apesar da fadiga ser caracterizada como um sintoma não motor, alguns fatores complicam sua compreensão na DP, a começar pela definição. Não existe definição exata para a fadiga devido a sobreposição entre ciência de cansaço e os sintomas clinicamente relevantes de fadiga, o que torna a percepção subjetiva (KLUGER, KRUPP e ENOKA, 2013). Dependendo do contexto, a fadiga pode ser definida de diferentes formas. O termo “fadiga”, quando usado por médicos ou pacientes, pode ter um significado que envolve situações desde a depressão mental até fraqueza neuromuscular (LOU *et al.*, 2001). Subjetivamente a fadiga é descrita como uma enorme sensação de cansaço, falta de energia ou sensação de exaustão (FRIEDMAN, 2009). Biologicamente, a fadiga pode ser definida pela incapacidade de sustentar a intensidade exigida durante o exercício, sendo dividida em; *a*) central; gerada por uma falha na transmissão neural e *b*) periférica; quando ocorre um acometimento metabólico de vias energéticas envolvidas no processo de ressíntese de ATP durante o exercício (CHAUDHURI e BEHAN, 2004; ROELANDS e MEEUSEN, 2010; FABBRINI *et al.*, 2012; RANIERI e DI LAZZARO, 2012).

Ainda, a fadiga pode ser descrita pelo termo “fatigabilidade”, no qual refere-se à dificuldade na iniciação ou sustentação das atividades, podendo ser também, física ou mental (KLUGER, KRUPP e ENOKA, 2013). Nesse caso, a fatigabilidade física é definida como a dificuldade em iniciar e manter uma atividade motora, ocorre em um curto período de tempo e pode ser avaliada quantitativamente em um laboratório. Já, a fatigabilidade mental é definida pela dificuldade em iniciar e manter a concentração por um determinado período de tempo, Figura 5. É importante ressaltar que a fadiga subjetiva e a fatigabilidade não estão necessariamente correlacionadas (LOU *et al.*, 2003b; LOU, 2009).

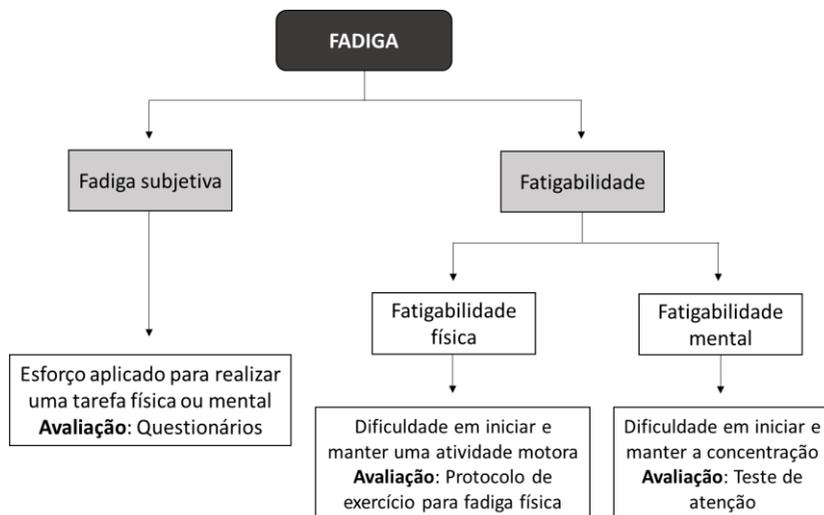


Figura 5: Representação esquemática da classificação de fadiga subjetiva e fadigabilidade na doença de Parkinson. Modificado de Lou et. al., 2009.

Ainda a fadigabilidade física pode ser consequência de fatores centrais ou periféricos (LOU, 2009; KLUGER, KRUPP e ENOKA, 2013). Acredita-se que a fadigabilidade central ocorra por meio do desequilíbrio entre neurotransmissores cerebrais (por exemplo, relação entre as concentrações de DA e 5-HT) influenciando o nível de ativação central, no qual determina a capacidade de sustentar uma atividade (MEEUSEN *et al.*, 2006; FOLEY e FLESHNER, 2008; LOU, 2009). Ao contrário, a fadigabilidade periférica, ocorre por consequência de um insucesso metabólico de vias energéticas envolvidas na síntese de ATP durante o exercício. No entanto, o processo fisiopatológico da fadiga central, que parece prevalecer na DP e outras doenças crônicas e progressivas, ainda não é bem compreendido (CHAUDHURI e BEHAN, 2004; LOU, 2009).

O aumento da fadigabilidade periférica durante a contração muscular tem sido demonstrado em pacientes com DP em comparação com indivíduos controle saudáveis (ZIV *et al.*, 1998; LOU *et al.*, 2001; LOU *et al.*, 2003b). Ziv e colaboradores relataram um aumento de 50% na fadigabilidade periférica ou física sem comprometer a geração de força máxima entre pacientes com DP e indivíduos controle (ZIV *et al.*, 1998). Garber e Friedman mostraram que os maiores índices de

fatigabilidade periférica em paciente com DP também estão associados a (i) redução na atividade física recreacional; (ii) pior desempenho em exercícios vigorosos; (iii) e menor mobilidade ativa durante as tarefas de vida diária, profissional e lazer (GARBER e FRIEDMAN, 2003). Ainda, um menor desempenho foi demonstrado em pacientes com DP avaliado pelos testes de caminhada de 6 minutos de duração e teste “*Timed Up and Go*” (levantar, percorrer 3 metros e retornar a cadeira) (GARBER e FRIEDMAN, 2003). Em contrapartida, outro estudo não encontrou diferença em pacientes com ou sem fatigabilidade no volume de atividade física diária usando um monitor de atividade (HOFF *et al.*, 1997). Entretanto, Winward e colaboradores demonstraram que pacientes com DP não apresentaram melhoras nos índices de fadiga após realizarem exercício físico por 12 semanas (WINWARD *et al.*, 2012).

Nesse sentido, embora algumas evidências sugerem que a terapia com L-DOPA (medicamento de primeira linha utilizado no tratamento da DP) pode reduzir a fadiga na DP (LOU *et al.*, 2003b; SCHIFITTO *et al.*, 2008), o efeito da L-DOPA na fadiga permanece pouco entendido. Estudos clínicos realizados em pacientes com DP, demonstraram que o metilfenidato (potente inibidor da recaptação de DA e noradrenalina) melhorou o escore de fadiga subjetiva em relação ao basal, utilizando como instrumento o questionário Inventário Multidimensional de Fadiga (*Multidimensional Fatigue Inventory - MFI*) (KLUGER, KRUPP e ENOKA, 2013), resposta similar também encontrada com L-DOPA. Uma única dose de L-DOPA melhorou o escore MFI e a fatigabilidade (LOU *et al.*, 2003b), bem como o índice de fadiga (ZIV *et al.*, 1998).

Embora a fatigabilidade periférica na DP tenha sido estudada por muitos pesquisadores (HOFF *et al.*, 1997; ZIV *et al.*, 1998; GARBER e FRIEDMAN, 2003), até o presente não são encontrados estudos sobre a fatigabilidade de origem central, sequer estudos sobre sua modulação com a prática de atividade física na DP. Apesar da fadiga comprometer negativamente a qualidade de vida dos pacientes com DP, essa nem sempre é reconhecida pelos profissionais de saúde. Esse fato pode decorrer do entendimento incompleto das bases fisiopatológicas da fadiga, a ausência de ferramentas para sua avaliação e/ou a limitação de seu tratamento. Desse modo, faz-se necessário uma maior compreensão acerca dos efeitos e mecanismos da fadiga envolvidos na DP e quais os benefícios reais do exercício físico e do tratamento com L-DOPA sobre este sintoma.

3. HIPÓTESE

Com base nos achados bibliográficos expostos nesta tese, foi possível formular as seguintes hipóteses: (*Capítulo I*) A deficiência dopaminérgica que caracteriza indivíduos com DP e a desregulação da atividade do sistema dopaminérgico é a causa do desenvolvimento de fadiga na DP; (*Capítulo II*) A sepiapterina urinária pode ser um biomarcador sensível e de fácil detecção para o estudo do metabolismo da BH4; (*Capítulo III*) O exercício físico pode prevenir o aumento de neopterin em um estado inflamatório crônico.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a participação do metabolismo das pterinas e da dopamina em mecanismos de hipersensibilidade à dor e fadiga sob condições inflamatórias.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I

- Investigar o efeito da desregulação dopaminérgica no desenvolvimento de fadiga e o efeito protetor da atividade física em camundongos Suíços adultos machos submetidos a um modelo experimental de DP.

Como estratégia experimental para induzir a desregulação da transmissão dopaminérgica utilizaremos um modelo animal de DP induzido pela administração intraperitoneal de reserpina. Ainda, com o intuito de restabelecer a mesma, os animais serão tratados com o precursor da dopamina, L-DOPA, juntamente com o inibidor periférico da dopamina, benserazida. O efeito protetor da atividade física será avaliado em rodas de correr por duas semanas. Posteriormente serão mensurados os seguintes parâmetros: (*i*) volume de atividade física diária por meio da roda de correr; (*ii*) concentrações de aminas biogênicas dopamina e serotonina, bem como dos fármacos L-DOPA e benserazida em estriado e plasma através da cromatografia líquida de alta performance; (*iii*) desempenho físico através de um teste de carga incremental; (*iv*) comportamentos de catalepsia, tipo depressivo, anedonia, dor mecânica e sistema nervoso simpático através dos testes comportamentais específicos de escore cataléptico, nado forçado, *splash test*, vonFrey e eletrocardiograma, respectivamente; e (*v*) conteúdo mitocondrial no músculo esquelético e estriado através da microscopia

eletrônica de ultraestrutura. Finalmente, para estudar mecanismos moleculares que eventualmente poderiam ser induzidos pela reserpina *per se*, serão quantificados em miotubos L6 expostos ao alcalóide a (vi) viabilidade celular, liberação de lactato, consumo de oxigênio mitocondrial e atividade da ATP sintase.

Capítulo II

- Investigar o efeito do tratamento com o inibidor da sepiapterina redutase, SPRi3, sobre a nocicepção e liberação de biomarcadores em urina de camundongos Balb/c adultos machos submetidos a um modelo experimental de artrite reumatoide.

Como estratégia experimental, a artrite reumatoide – empregada aqui como modelo de dor crônica - será induzida pela administração do coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA) e LPS em camundongos Balb/c adultos machos. Posteriormente, serão mensurados os parâmetros de nocicepção (i) alodinia mecânica e térmica através dos testes comportamentais de vonFrey e Hargraves; os biomarcadores presentes em fluídos biológicos (ii) concentrações de BH4 e sepiapterina em urina mensurados através da cromatografia líquida de alta performance; e (iii) a participação dos macrófagos sobre a dor inflamatória através da administração de clodronate.

Capítulo III

- Investigar as concentrações de neopterinina em urina e a concentração dos neurotransmissores dopamina, serotonina e seus metabólitos no estriado de camundongos C57BL/6 adultos machos submetidos a inflamação crônica por LPS e/ou a um protocolo de exercício físico.

Como estratégia experimental para a indução da inflamação crônica foi administrado LPS de forma contínua por um período de duas semanas em camundongos C56BL/6 adultos machos. O efeito preventivo do exercício físico será avaliado em esteira por três semanas. Posteriormente, serão mensurados os seguintes parâmetros: (i) concentrações de neopterinina em urina através da cromatografia líquida de alta performance; (ii) concentrações de aminas biogênicas dopamina e serotonina em estriado através da cromatografia líquida de alta performance; (iii) atividade do complexo I mitocondrial em músculo esquelético por espectrofotometria; e (iv) desempenho físico através de um teste de carga incremental.

5. CAPÍTULO I: PAPEL DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO NA FATIGABILIDADE EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR RESERPINA

De acordo com a hipótese e os objetivos apresentados, neste capítulo, mostraremos a restauração nas concentrações de DA no estriado induzidas pela administração de L-DOPA, em animais tratados com reserpina e os efeitos dos tratamentos nos sintomas de fadiga.

A reserpina é um inibidor irreversível do VMAT2 que impede o armazenamento vesicular de DA, ver Figura 6. Assim, a DA permanece no citoplasma, sendo rapidamente oxidada pela monoamina oxidase (MAO)-B, o que causa a depleção de monoaminas em tecidos neurológicos, incluindo a noradrenalina, 5-HT, e DA (DUTY e JENNER, 2011). O modelo experimental de DP induzido por reserpina foi escolhido para este trabalho, pois é um modelo que apresenta boa predição clínica, ou seja, com boa resposta ao fármaco L-DOPA (CARLSSON, LINDQVIST e MAGNUSSON, 1957).

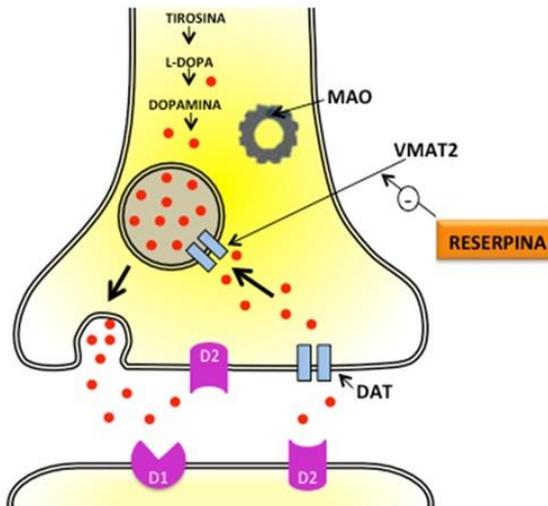


Figura 6. Representação esquemática da inibição do transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) pela reserpina. O transporte vesicular de dopamina (DA) é realizado através do VMAT2, e a captação da DA extracelular, pelo transportador de DA plasmático (DAT). A reserpina inibe o VMAT2 e bloqueia o armazenamento de DA nas vesículas sinápticas. A DA que estará livre no citoplasma será oxidada pela monoamina oxidase (MAO)-B. Os receptores D1 e D2 medeiam a transmissão dopaminérgica.

5.1. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos Suíços machos adultos (30-40g) obtidos do Biotério Central da UFSC e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde permaneceram sob um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas, a uma temperatura ambiental de aproximadamente 22 ± 1 °C, com acesso livre à água e ração para roedores (Nuvital, PR, Brasil). A partir do primeiro dia de experimentos os animais foram mantidos em caixas plásticas individuais. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (PP00760/CEUA) da UFSC.

5.1.2. Indução experimental da DP

A DP experimental foi induzida farmacologicamente pela administração de duas doses de 1mg/kg de reserpina por via intraperitoneal (i.p) (DUTRA *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2006), de acordo com os Desenhos Experimentais apresentados nas Figuras 9A, 10A, 11A e 13A. A reserpina foi diluída em ácido acético glacial 0,1% em solução cloreto de sódio 0,9% (veículo) e foi injetado um volume de 0,1mL por cada 10g de massa corporal. Os animais do grupo controle receberam igual volume de ácido acético glacial 0,1% em solução cloreto de sódio 0,9% (AGUIAR *et al.*, 2009).

5.1.3. Tratamento com fármacos

As doses selecionadas de L-DOPA, precursor utilizado para restituir as concentrações de DA, e benserazida, inibidor da conversão periférica de DA, foram baseadas em experimentos pilotos realizados em nosso laboratório. Os resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa demonstraram que 100 mg/kg de L-DOPA e 50 mg/kg de benserazida reestabelecem as concentrações cerebrais de DA, quando reduzidas pela administração de reserpina, além de restaurar os parâmetros motores, incluindo a redução da atividade locomotora e a catalepsia.

Os fármacos foram diluídos em metabissulfito de sódio 0,1% em cloreto de sódio 0,9% (veículo) em um volume de injeção de 0,1mL por cada 10g de massa corporal. Os animais do grupo controle receberam igual volume de veículo (SINGH e KULKARNI, 2002).

5.1.4. Protocolo de atividade física

Neste trabalho foi empregado um protocolo de atividade física voluntária mostrado nos Desenhos Experimentais das Figuras 9A e 10A. O protocolo consistiu em 14 dias de livre acesso do animal à roda de correr. As rodas equipadas com contadores digitais foram alocadas dentro das gaiolas como mostra a Figura 7 B-C. A distância percorrida foi diariamente avaliada para a verificação do desempenho do animal. Os animais que por algum motivo não correram foram transferidos para o grupo sedentário. Para evitar o viés de enriquecimento ambiental nos resultados, rodas de correr bloqueadas foram alocadas nas gaiolas dos animais sedentários (grupos controles; Figura 7A).



Figura 7. Rodas de correr empregadas no protocolo de atividade física. (A) Gaiola com roda de correr bloqueada utilizada nos grupos experimentais denominados “sedentários”. (B) Gaiola com roda de correr empregada nos grupos experimentais denominados “atividade física”. (C) Contador de distância percorrida pelos animais que foram submetidos ao protocolo de atividade física.

5.1.5. Desenhos experimentais

Os desenhos experimentais utilizados, bem como, o esquema de administrações dos fármacos para cada objetivo, podem ser encontrados nas Figuras 9A, 10A, 11A e 13A (seção de Resultados).

Após a eutanásia dos animais do Desenho Experimental I (Figura 9A), o sangue foi coletado em tubos com anticoagulante e centrifugado a $7.000 \times g$ por 10min para obtenção do plasma. Além disso, o cérebro foi dissecado para a coleta do estriado. As amostras foram mantidas a -86°C até a análise de quantificação das monoaminas. Outro grupo de animais foi anestesiado mediante a administração intraperitoneal de cetamina (80mg/kg) e xilasina (20mg/kg), e posteriormente perfundidos com cloreto de sódio 0,9%. Após, os tecidos

estriado e quadríceps foram dissecados e colocados em fixador Karnovsky, para a realização das análises ultraestruturais por microscopia eletrônica.

5.1.6. Procedimentos e análises

Tanto a experimentação quanto as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, LABOX, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC.

Para as avaliações comportamentais referentes aos testes de catalepsia, campo aberto, nado forçado e esforço físico, utilizou-se o espaço físico do Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, coordenado pelo Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger do Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC.

As avaliações comportamentais referentes aos testes *splash test*, vonFrey e eletrocardiograma, foram realizados em colaboração com o Laboratório Woolf, Departamento de Neurobiologia, *Kirby Neurobiology Center, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School*, Boston, Estados Unidos. As mensurações foram supervisionadas pelo Dr. Nick Andrews, e realizadas durante o estágio de doutorado sanduíche.

As mensurações de lactato foram realizadas utilizando o lactímetro alocado no Laboratório de Esforço Físico, Centro de Desportos, UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Guilherme A. Guglielmo.

As análises de microscopia eletrônica foram realizadas durante treinamento no Centro de Microscopia Eletrônica, *Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Córdoba*, UNC, e supervisionadas pela Dra. Ana Lucia De Paul.

5.1.7. Avaliações comportamentais

Em todos os testes comportamentais os animais foram transportados para ambientação à sala de experimentos climatizada, uma hora antes do início das tarefas comportamentais, as que foram realizadas durante a fase clara do ciclo do roedor.

5.1.7.1 Avaliação de postura cataléptica

A administração de reserpina em roedores provoca prejuízos na rigidez muscular, que foi avaliada através da postura cataléptica após 30min e 60min de uma única administração de L-DOPA/benserazida 100/50 mg/kg. Foi registrado o tempo de imobilidade das patas

dianteiras e das patas traseiras sobre uma barra horizontal (3mm de diâmetro, 4,5cm de altura, 10cm de largura). A postura cataléptica foi avaliada de acordo com o escore apresentado na Tabela 1 (SHIOZAKI *et al.*, 1999).

Tabela 1: Escore utilizado para o teste de avaliação da postura cataléptica.

Escore de catalepsia	Postura cataléptica
0	< 5s em ambas as patas dianteiras e traseiras
1	das patas dianteiras durante 5 a 10s, e das patas traseiras < 5s, ou vice-versa
2	das patas dianteiras > 10s, e das patas traseiras < 5s
3	das patas dianteiras e traseiras durante 5 a 10s, ou postura cataléptica das patas dianteiras < 5s e das patas traseiras > 10s
4	das patas dianteiras > 10s, e traseiras durante 5 a 10s, ou postura cataléptica de patas dianteiras 5-10s, e traseiras > 10s
5	das patas dianteiras e traseiras > 10s

O valor do escore cataléptico variou entre 0 (< 5s) e 5 (> 10s). Adaptado de (SHIOZAKI *et al.*, 1999).

5.1.7.2 Teste incremental máximo em esteira rolante

O teste teve início 30min após a administração de L-DOPA/benserazida 100/50 mg/kg. Nós escolhemos este tempo por ser o que apresentou as maiores concentrações de DA estriatais após a administração de L-DOPA, ver Figura 8A. O teste iniciou com velocidade de 16m/min, com inclinação de 2%. A velocidade foi incrementada em 2m/min a cada 3min até a exaustão voluntária, a qual é definida como a desistência do animal ao exercício (DAVIS *et al.*, 1998; DAVIS *et al.*, 2009). Após atingir a exaustão, 25µL de sangue foram coletados com um capilar heparinizado, através da realização de um pequeno corte na porção distal da cauda do animal. O sangue foi empregado para a mensuração das concentrações de lactato. Para isso, o sangue foi colocado em tubos plásticos contendo 50µL de fluoreto de sódio 1% com o intuito de inibir a via glicolítica, e o lactato foi mensurado em analisador específico YSL 2700 (YSL 2700, Yellow Springs, CA, USA).

A carga de trabalho foi estimada através da seguinte fórmula matemática: (i) vertical; $W (watts) = (P \times 9,81) \times V \times T \times I$. Esta leva em consideração o peso (kg) dos animais, a aceleração da gravidade ($9,81\text{m/s}^2$), a velocidade (m/s), o tempo (min) e a inclinação (%) da esteira. (ii) horizontal; $W = (P \times 9,81) \times V \times T$ (GREEN, 1995; NEDER e NERY, 2003).

O período de adaptação e o teste incremental foram realizados a partir das 18h, período que corresponde ao ciclo claro dos animais. Esses animais foram utilizados exclusivamente para este propósito, pois as coletas de sangue caudal, somadas ao estresse de um teste máximo, poderiam influenciar no comportamento e parâmetros bioquímicos dos animais.

5.1.7.3 Teste nado forçado

O teste de nado forçado é um dos modelos mais tradicionais para o estudo do comportamento tipo depressivo em animais de laboratório por apresentar alto valor preditivo, devido á resposta positiva aos medicamentos antidepressivos existentes. O teste se baseia em submeter os animais a uma situação aversiva. Os animais foram individualmente forçados a nadar em um cilindro (\emptyset 16cm, 30cm high) com água $25 \pm 1^\circ\text{C}$, onde os animais não podem tocar o fundo do cilindro ou fugir. O experimento foi registrado por 5min em vídeo e a imobilidade corporal foi avaliada através da plataforma ANY-maze™ (PORSOLT, BERTIN e JALFRE, 1977).

5.1.7.4 Splash test

O *splash test* foi utilizado para avaliar comportamento motivacional/anedonia, a qual foi observada pelo comprometimento do comportamento de autolimpeza, caracterizado como a limpeza da pele ao lamber ou coçar, após a pulverização com uma solução de sacarose 10% no dorso do animal. Aproximadamente 1mL de uma solução de sacarose 10% foi esguichada no dorso do animal que se encontrava isolado visual e acusticamente em uma caixa preta (20cm x 20cm x 20cm, com tampa). A base da caixa que continha o animal era de vidro para permitir a observação e o registro do comportamento de autolimpeza por uma câmera, sem influenciar o comportamento do roedor. O tempo de autolimpeza denominado de *grooming* foi gravado por um período de 5min como índice de autocuidado e latência para iniciar a autolimpeza (NOLLET, LE GUIQUET e BELZUNG, 2013).

5.1.7.5 Teste de von Frey

A nociceção foi avaliada através da alodinia mecânica com o teste de von Frey. Neste teste os animais permanecem em uma plataforma de arame elevada para permitir o acesso à superfície ventral das patas traseiras. Os filamentos de von Frey são inseridos através dos arames para “pinicar” as patas traseiras do animal com gramaturas crescentes exercidas por filamento de 0,008; 0,02; 0,07; 0,16; 0,4; 1,4; e 2g. Cada filamento foi testado 10 vezes em ordem crescente, começando com o filamento que produz menor força. As reações normais observadas incluem retirar ou lambe a pata (DIXON, 1980; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

5.1.7.6 Eletrocardiograma (ECG)

Para avaliar o efeito da administração de reserpina sobre o sistema cardiovascular, os animais foram colocados sobre a plataforma do sistema ECGenie (*Mouse Specifics, Massachusetts, EUA*). O intuito desta avaliação baseia-se no efeito ativador do sistema nervoso simpático deste alcaloide. Para isto, os animais foram aclimatizados por 2-3min antes da gravação do ECG, a qual foi realizada por 5s. O intervalo R-R e a FC foram calculados automaticamente pelo software (CHU *et al.*, 2001).

5.1.8. Mensurações bioquímicas

5.1.8.1 Quantificação de L-DOPA, DA, DOPAC, 5-HT e benserazida

As amostras de plasma e estriado foram tratadas com ácido perclórico 0,1M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio e posteriormente sonicadas e centrifugadas a 16.000 x g por 10min a 4°C (CASTRO *et al.*, 2012). Os metabólitos presentes no sobrenadante foram quantificados por cromatografia líquida de alta performance acoplada a detecção eletroquímica (HPLC; *Alliance e2695*, detector *Waters 2465*, *Waters, Milford, USA*). Vinte microlitros do sobrenadante foram injetados no sistema de HPLC. O sistema foi constituído por coluna C18 de fase reversa (15cm x 4,6mm e 3µm de tamanho de partícula; *Synergi Hydro, California, USA*), com fase móvel conformada por fosfato de sódio 90mM, ácido cítrico 50mM, sódio 1-heptano sulfonato 1,7mM, ácido etilenodiaminotetracético 50µM, 10% de acetonitrila, pH 3,0, e fluxo de 0,25 mL/min. As concentrações de L-DOPA, DA, DOPAC, 5-HT e benserazida foram calculadas em ng/mg de proteína para o estriado e nmol/L para o plasma.

5.1.8.2 Dosagem de proteína

O conteúdo proteico das amostras foi mensurado empregando o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

5.1.9. Parâmetro de ultraestrutura

5.1.9.1 Morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica

Após a perfusão dos animais com cloreto de sódio 0,9%, o músculo esquelético quadríceps e o estriado cerebral foram removidos e fixados imediatamente em solução Karnovsky conformada por formaldeído 4%, glutaraldeído 2% e tampão cacodilato 0,1M, pH 7,3. O material permaneceu nesta solução durante quatro horas a 4°C e posteriormente foi submetido a três lavagens de 30min em água destilada. Em seguida as peças foram colocadas em tampão cacodilato contendo tetróxido de ósmio 1% por 2h em um rotor em movimento a temperatura ambiente, e foram novamente lavadas em água destilada. O material foi posteriormente desidratado em concentrações crescentes de acetona (50 e 75% por 5min; 90% por 10min; e 3 x de 100% por 15min). Após foi realizada uma inclusão com araldita e acetona 100% (1:1) e deixado por 3h em um rotor em movimento a temperatura ambiente. Foi realizada uma pré-inclusão com araldita pura por 6h a temperatura ambiente e posteriormente as peças foram novamente incluídas em araldita e colocadas em estufa a 60°C por 48h (HERNANDEZ-FONSECA *et al.*, 2009). Após, foram realizados cortes semifinos (240-280nm) para localização da área de interesse, e posteriormente foram realizados os cortes finos (90-120nm), que foram cortados com uma navalha de diamante em um ultramicrotomo JEOL JUM-7 (*Nikon, Tóquio, Japão*). Os cortes finos foram contrastados com acetato de urânio e citrato de plomo 1% por 1min, para serem analisados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Leo 906 E, equipado com câmera digital Megaview III (*Oberkochen, Alemanha*) do Centro de Microscopia Eletrônica da *Universidad Nacional de Córdoba*. Para contagem do conteúdo mitocondrial foram analisados 100 campos por animal.

5.1.10. Experimentos *in vitro*

5.1.10.1 Cultura de células

Células musculares da linhagem L6 foram expostas a concentrações crescentes de reserpina com o intuito de analisar eventuais efeitos do alcaloide sobre a fisiologia mitocondrial. As células L6 correspondem a uma linhagem celular de mioblastos de músculo

esquelético de rato, e foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram semeadas em frascos e cultivadas em meio Eagle's com modificação de Dubelcco (DMEM), pH 7,4, contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), solução estéril antimicótica 100 x, penicilina 100 IU/mL, estreptomicina 0,1 mg/mL, D-glicose 5,5 mM, glutamina 2%, NaHCO₃ 0,22%, HEPES 0,47% e mantidas em uma estufa a 37°C, com um mínimo de 95% de umidade relativa e em uma atmosfera de ar com 5% de CO₂. Após a confluência, as células foram cultivadas em DMEM contendo 2% SFB e foram mantidas por 5-7 dias para induzir a diferenciação em miotubos, com mudanças de meio a cada 48h.

5.1.10.2 Viabilidade celular

O ensaio de redução do MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) foi utilizado para avaliar a viabilidade celular. As desidrogenases ativas clivam e reduzem o corante de MTT amarelo solúvel no formazan roxo insolúvel (MOSMANN, 1983). Para isso, os miotubos L6 foram semeados à uma densidade de 1×10^4 por poço em uma placa de 96 poços em meio apropriado e incubados com reserpina (10 μ M) e/ou rotenona (20 μ M; controle positivo) por 3h em estufa com atmosfera humidificada 5% CO₂/95% O₂, a 37°C. Ao final da incubação o teste de MTT foi realizado. A formação do formazan foi analisada espectrofotometricamente a 570 nm. Os resultados foram indicados por porcentagem do controle, o qual 100% da atividade foi atribuída.

5.1.10.3 Liberação de lactato

A liberação de lactato no sobrenadante de células L6 expostas a reserpina (10 μ M) e/ou rotenona (20 μ M; controle positivo) por 3h foi analisada usando um analisador específico YSL 2700 (YSL 2700, Yellow Springs, CA, USA). Os resultados foram expressos por mmol/L.

5.1.10.4 Consumo de oxigênio mitocondrial

O consumo de oxigênio foi mensurado à 37°C por meio da respirometria de alta-resolução usando o oxígrafo Oroboros® (PESTA e GNAIGER, 2012). O *software* DatLab (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) foi usado para aquisição dos dados e análise. Para isso, os miotubos L6 foram semeados à uma densidade de 2×10^5 por poço em uma placa de 6 poços em meio apropriado. Após confluência, as células foram suspensas em meio apropriado sem SFB à uma

concentração de 300.000 células/mL na cubeta do oxígrafo Oroboros. O protocolo experimental começou com a determinação da RESPIRAÇÃO BASAL, a qual é definida pelo consumo de oxigênio sem adição de substratos ou efetores. Após a observação de um estado estacionário do fluxo respiratório (em torno de 20-30min), uma titulação com concentrações crescentes de reserpina (0,005; 0,05; 0,5 e 5 ng/mL) ou veículo (ácido acético 0,1%) foi realizada. Posteriormente, a contribuição da atividade da ATP sintase no consumo de oxigênio basal foi mensurada após a adição do inibidor oligomicina (1 µg/mL). Esta mensuração é definida como *LEAK* (vazamento de prótons), e é seguido pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa com titulação com FCCP (*carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone*) até atingir a capacidade máxima de transferência de elétrons (*ETS*). Finalmente a respiração mitocondrial foi inibida pela adição sequencial de rotenona (0,5µM; inibição da atividade do complexo I) e antimicina A (2,5µM; inibição da atividade do complexo III), para medir o consumo de oxigênio residual (*ROX; residual oxygen consumption*). A contribuição da atividade da ATP sintase e foi expressa por % do controle (REMOR *et al.*, 2011).

5.2. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM), a exceção do comportamento cataléptico que foi expresso em mediana \pm intervalo interquartil, e o teste de esforço máximo foi expresso em percentual de animais por etapa da tarefa. A análise dos dados foi iniciada através da aplicação de procedimentos de estatística descritiva, incluindo medidas de tendência central e dispersão. A normalidade das diferentes variáveis contínuas foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk.

A análise inferencial da estatística foi realizada na maioria dos desenhos experimentais, através de análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni, quando os valores de *F* foram significativos. No caso da análise das concentrações de dopamina e DOPAC, conteúdo mitocondrial e atividade da ATP sintase utilizou-se o teste *t* de Student para comparar os animais tratados com reserpina com seus respectivos controles.

Para observar diferenças entre grupos no teste ergométrico utilizou-se o teste de Log-rank (Mantel-Cox). A diferença da severidade das posturas catalépticas foi avaliada pelo teste Kruskal-Wallis, com teste *pos hoc* de múltiplas comparações de Dunn's.

As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$ (IC=95%). As análises estatísticas e gráficos foram realizados através do programa GraphPad Prisma 6®.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Curva de distribuição da L-DOPA, da benserazida, e a formação de dopamina no plasma e estriado de camundongos Suíços machos

A Figura 8 mostra a quantificação do fármaco L-DOPA, da benserazida e do neurotransmissor DA no plasma e estriado, após a administração aguda i.p. de L-DOPA (100 mg/kg) e benserazida (50 mg/kg). Com o intuito de verificar o melhor tempo-resposta do fármaco para os experimentos posteriores, uma curva de tempo foi realizada como indicado a seguir 0, 10, 20, 30, 60 e 120 min após a administração dos fármacos.

Confirmando dados da literatura, a Figura 8A mostra que a maior concentração de DA no estriado ocorreu após 30min da administração de L-DOPA e permaneceu elevada até 1h após [$F_{(5,20)}=6,84$; $P < 0,005$] (linha azul). Um comportamento similar foi observado para a L-DOPA no plasma [$F_{(5,20)}=58,05$; $P < 0,001$] e no estriado [$F_{(5,20)}=44,33$; $P < 0,001$] (linhas laranja). A benserazida foi detectada no plasma apenas nos tempos 10 e 20min após sua administração [$F_{(3,12)}=41,71$; $P < 0,001$] (linha verde). A concentração de DA no plasma, bem como a de benserazida no estriado não foram detectáveis. Ainda, a Figura 8B mostra que a L-DOPA foi detectável no tempo de 30min, apenas no plasma dos animais que receberam a administração de L-DOPA + benserazida [$F_{(3,17)}=7,52$; $P < 0,001$], e estas concentrações não foram diferentes de animais que realizaram atividade física voluntária por duas semanas (ver Desenho Experimental I, Figura 9A).

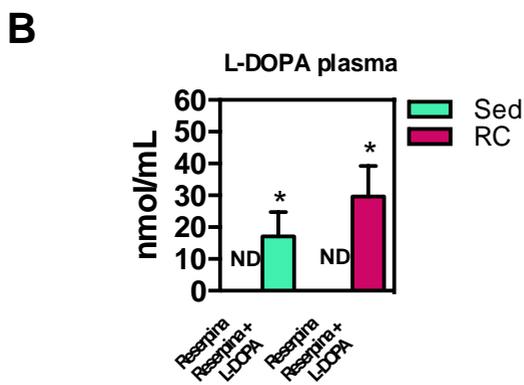
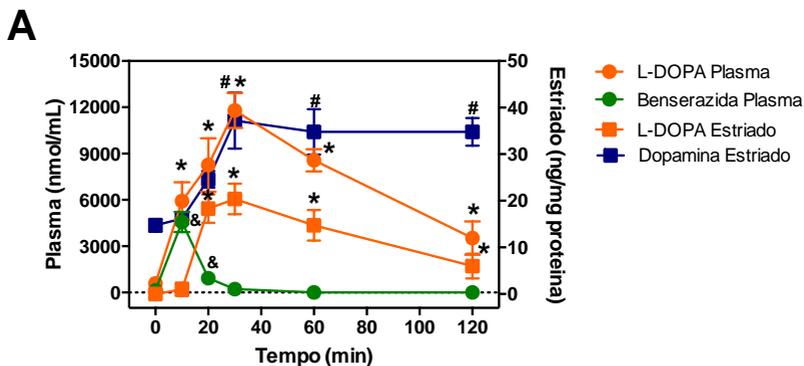


Figura 8: Cinética da L-DOPA, benserazida e dopamina (DA) no plasma e estriado de animais após a administração de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg, i.p) (A). Concentrações de L-DOPA plasmáticas de animais que realizaram atividade física voluntária por duas semanas e receberam o tratamento com L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg, i.p) (B). Os dados representam a média \pm erro padrão da média (5 animais por grupo). Sed: sedentário; RC: roda de correr; ND: não detectável. DA: # $P \leq 0,005$ vs. tempo 0; L-DOPA: * $P \leq 0,001$ vs. tempo 0 e benserazida: & $P \leq 0,001$ vs. tempo 0 (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Bonferroni).

5.3.2 Caracterização do modelo de doença de Parkinson induzido pela administração repetida de reserpina em camundongos Suíços adultos

Os experimentos descritos neste item foram realizados durante meu mestrado (anos de 2011-2013), no qual nós caracterizamos o modelo experimental utilizado. O Desenho Experimental I iniciou com o livre acesso dos animais as rodas de correr sem nenhum outro tratamento adicional durante os dias 1º ao 10º. No 11º e 13º dias, os animais receberam uma dose de reserpina (1 mg/kg), e entre os dias 11º e 14º receberam seis doses de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg) ou de seus respectivos veículos com intervalo de 12h, como ilustrado pela Figura 9A.

A Figura 9B mostra a distância percorrida pelos animais na roda de correr durante 11 dias sem nenhum tratamento adicional. Pode ser observado, que a distância percorrida no primeiro dia foi de 1.888 ± 281 metros/dia, e que esta aumentou significativamente para 3.505 ± 345 metros/dia, ao longo de 11 dias.

A Figura 9C mostra a soma da distância percorrida nos últimos 3 dias do protocolo experimental. Pode-se observar que após a administração de reserpina houve uma diminuição significativa na atividade locomotora voluntária. No entanto, a administração de L-DOPA/benserazida preveniu a redução na atividade locomotora induzida por reserpina, apresentando um aumento significativo quando comparado ao grupo reserpina [$F_{(2,17)}=23,65$; $P < 0,05$].

As Figuras 9D, 9E e 9F mostram o efeito da administração de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg) nas concentrações estriatais de DA, do seu metabólito DOPAC e de 5-HT, respectivamente, em animais que receberam reserpina e que realizaram atividade física voluntária (ver Desenho Experimental I, Figura 9A). Pode ser observado na Figura 9D que a administração de reserpina diminuiu as concentrações de DA em animais sedentários ($P < 0,05$) e exercitados ($P < 0,001$). Ainda a Figura 9D mostra que o tratamento com L-DOPA/benserazida restituiu as concentrações de DA encontradas no estriado de animais que receberam reserpina [$F_{(5,23)}=6,15$; $P < 0,001$]. De forma similar, na Figura 9E as concentrações de DOPAC no estriado foram diminuídas em animais sedentários ($P < 0,001$) quando administrada a reserpina. A figura também mostra que com a administração de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg) as concentrações do metabólito foram aumentadas [$F_{(5,24)}=5,24$; $P < 0,01$] em ambos os grupos sedentário e atividade física.

A Figura 9F mostra que a administração de L-DOPA/benserazida aumentou as concentrações de 5-HT no estriado de animais sedentários e ativos [$F_{(5,21)}=5,31$; $P < 0,002$]. No entanto, a Figura 9G mostra um aumento na relação entre as concentrações estriatais de 5-HT e DA apenas nos animais que receberam reserpina e realizaram atividade física [$F_{(3,12)}=5,19$; $P < 0,01$].

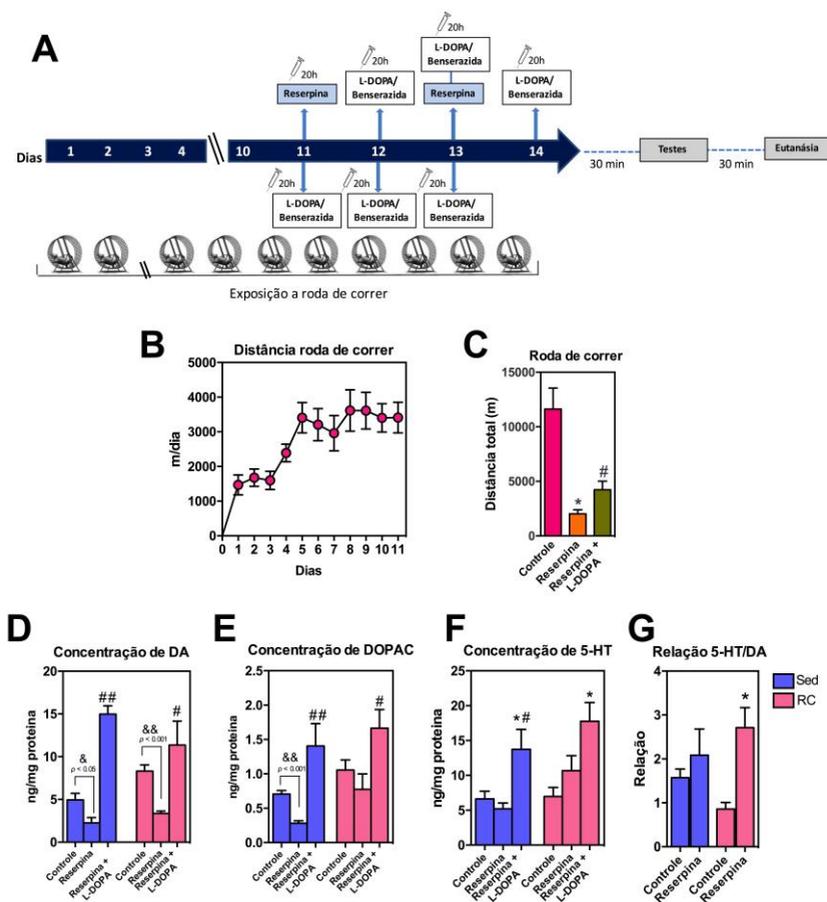


Figura 9: Caracterização do modelo experimental da doença de Parkinson induzido por reserpina, e o efeito de L-DOPA/benserazida. Camundongos Suíços machos adultos tiveram livre acesso a roda de correr durante 14 dias. Foram aplicadas duas doses de reserpina (1 mg/kg) e seis doses de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg) nos dias e horários especificados no

esquema (Desenho Experimental I; A). Distância percorrida pelos animais do grupo atividade física durante 11 dias (B) e efeito da administração de reserpina e/ou a combinação de L-DOPA/benserazida e da atividade física voluntária na distância percorrida na roda de correr (C) e nas concentrações estriatais de DA (D), DOPAC (E), 5-HT (F) e da relação 5-HT e DA (G). Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 3 experimentos (5 animais por grupo). Sed: sedentário; RC: roda de correr. * $P < 0,05$ vs. grupo controle; # $P < 0,05$, e ## $P < 0,01$ vs. grupo reserpina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Bonferroni), & $P < 0,05$ e && $P < 0,001$ vs. grupo controle (teste *t* de Student).

5.3.3 Efeito da atividade física voluntária e do tratamento farmacológico com L-DOPA, sobre a rigidez muscular induzida pela administração de reserpina no modelo experimental da doença de Parkinson

O Desenho Experimental II teve duração de 14 dias e iniciou com o livre acesso dos animais às rodas de correr sem nenhum outro tratamento adicional nos dias 1º a 10º. No 11º e 13º dias os animais receberam uma dose de reserpina (1 mg/kg) e no 14º dia eles receberam uma dose única de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg) ou de seus respectivos veículos. O comportamento cataleptico nestes animais foi avaliado 30 e 60min após a administração de L-DOPA/benserazida, como ilustrado pela Figura 10A.

O efeito da atividade física voluntária sobre a rigidez muscular em camundongos que receberam reserpina é mostrado nas Figuras 10B e 10C. Pode ser observado que a atividade física *per se* atenuou a catalepsia induzida pela administração de reserpina 30 [$F_{(3,47)}=35,58$; $P < 0,05$] e 60min [$F_{(3,39)}=7,05$; $P < 0,05$]. A figura também mostra que ao tratamento com L-DOPA/benserazida atenuou a severidade cataleptica de animais sedentários que receberam reserpina, nos tempos 30 [$F_{(6,74)}=16,6$; $P < 0,05$] (Figura 10B) e 60min [$F_{(6,66)}=22,8$; $P < 0,05$] (Figura 10C), após a administração de L-DOPA/benserazida.

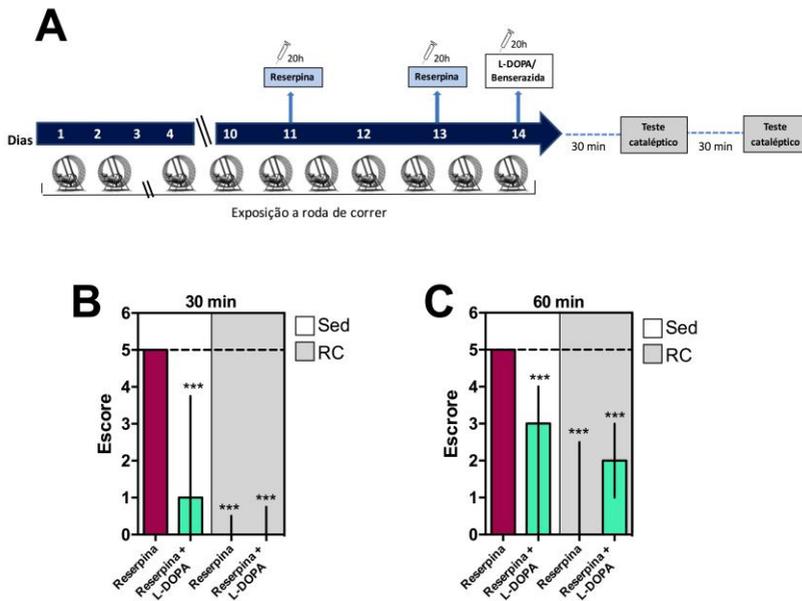


Figura 10: Efeito da atividade física voluntária e da administração da combinação de L-DOPA/benserazida, sobre a rigidez muscular induzida pela administração de reserpina em animais expostos a rodas de correr. Camundongos Suíços machos adultos tiveram livre acesso a roda de correr durante 14 dias. A reserpina (1 mg/kg) foi administrada intraperitonealmente (i.p.) nos dias 11º e 13º, e no dia 14º foi realizada uma única administração i.p. de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg) (Desenho Experimental II; A). A rigidez muscular foi avaliada através de um escore de catalepsia (ver Tabela 1), após 30 (B) e 60 minutos (C) da administração de L-DOPA/benserazida. Os dados representam a mediana \pm intervalo interquartil de 3 experimentos (10 animais por grupo). Sed: sedentário; RC: roda de correr. *** $P < 0,001$ vs. grupo reserpina (ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Dunn's).

5.3.4 Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA, sobre o desempenho físico em animais submetidos a um teste de esforço máximo em esteira

No Desenho Experimental III os animais foram inicialmente adaptados à esteira durante cinco dias, numa velocidade de 10 m/min, por 10min. Após o último dia de adaptação, os animais receberam a primeira dose de reserpina (1 mg/kg), e 48h após, a segunda dose. Vinte e quatro horas após a segunda dose, os animais receberam uma única

dose da combinação de fármacos LDOPA/benserazida (100/50 mg/kg), ou de seus respectivos veículos nos animais do grupo controle. Trinta minutos após, deu-se início ao teste incremental máximo que avaliou a capacidade máxima de esforço, como ilustrado pela Figura 11A.

A Figura 11B mostra o desempenho físico dos animais submetidos a um teste de incremental em esteira ergométrica, avaliada através da porcentagem de sucesso de cada grupo em finalizar o teste. Pode ser observado na figura que a administração de reserpina provocou uma redução significativa na capacidade física em completar o teste de esforço, tendo atingido o estado de exaustão na velocidade de aproximadamente 30 m/min (grupo reserpina; $P < 0,05$). Os animais controles permaneceram no teste até aproximadamente 40 m/min, que provavelmente responde à velocidade máxima imposta pelas próprias limitações biomecânicas. Pode ser também observado que a administração de L-DOPA/benserazida na dose de 100/50 mg/kg, melhorou o efeito induzido pela reserpina na primeira metade do teste (50 % de sucesso; $P < 0,05$). Efeitos similares foram observados na Figura 11C que mostra a estimativa da carga de trabalho vertical [$F_{(2,48)}=81,81$; $P < 0,05$] e horizontal [$F_{(2,48)}=103,3$; $P < 0,05$]. Adicionalmente, a Figura 11D mostra que as concentrações de lactato foram significativamente menores nos animais do grupo que recebeu exclusivamente reserpina [$F_{(2,42)}=4,10$; $P < 0,05$], concordando com a menor capacidade física destes animais em suportar exercício de alta intensidade (Figuras 11B e 11C), e abandonando o teste antes de atingir o estado de exaustão.

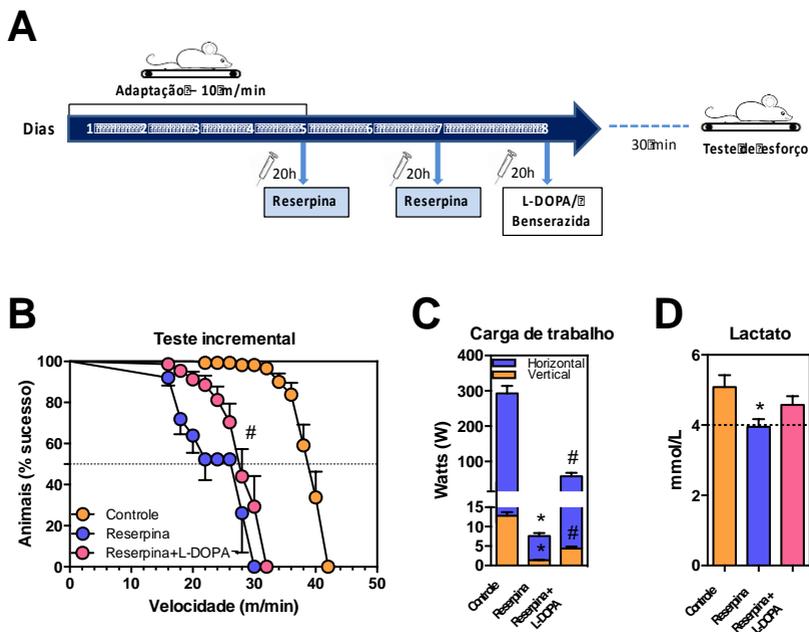


Figura 11: Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA, sobre o desempenho físico em animais submetidos a um teste de esforço máximo em esteira. Camundongos Suíços machos adultos foram adaptados durante cinco dias na esteira a uma velocidade de 10m/min, durante 10 min. A reserpina (1 mg/kg) foi aplicada nos dias 5° e 7°, e no dia 8° foi administrada uma única dose de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg). O teste incremental máximo em esteira rolante foi realizado 30 minutos após a última administração de L-DOPA/benserazida (Desenho Experimental III; A). Efeito da administração de reserpina e/ou a combinação de L-DOPA/benserazida sobre a performance (B), carga de trabalho (C) e concentrações de lactato sanguíneas (D), em animais submetidos a um teste de esforço máximo em esteira. A performance foi avaliada através da porcentagem de sucesso de cada grupo experimental (número de animais) em finalizar o teste de esforço. Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 2 experimentos (15 animais por grupo). * $P < 0,05$ vs. grupo controle; # $P < 0,05$ vs. grupo reserpina (Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para o teste ergométrico e ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Bonferroni para os demais parâmetros).

5.3.5 Efeito da administração de reserpina sobre o conteúdo mitocondrial em músculo esquelético e estriado de animais submetidos a atividade física voluntária em roda de correr

A Figura 12 mostra o conteúdo mitocondrial em músculo esquelético quadríceps (Figuras 12A e 12B) e estriado (Figuras 12C e 12D) de animais que correram na roda de correr por 14 dias. O protocolo iniciou com o livre acesso dos animais as rodas de correr sem nenhum outro tratamento adicional durante os dias 1º ao 10º. No 11º e 13º dia, os animais receberam uma dose de reserpina (1 mg/kg) ou de seu respectivo veículo, de acordo com o Desenho Experimental I (Figura 9A).

Nas Figuras 12A e 12C o * em amarelo mostra a localização das mitocôndrias. A Figura 12B mostra que a reserpina ou a atividade física durante 14 dias não modificou o conteúdo mitocondrial no músculo esquelético quadríceps. No entanto, a Figura 12D mostra que a reserpina aumentou o conteúdo mitocondrial no estriado de animais sedentários ($P < 0,05$), sem modificações no grupo que realizou atividade física.

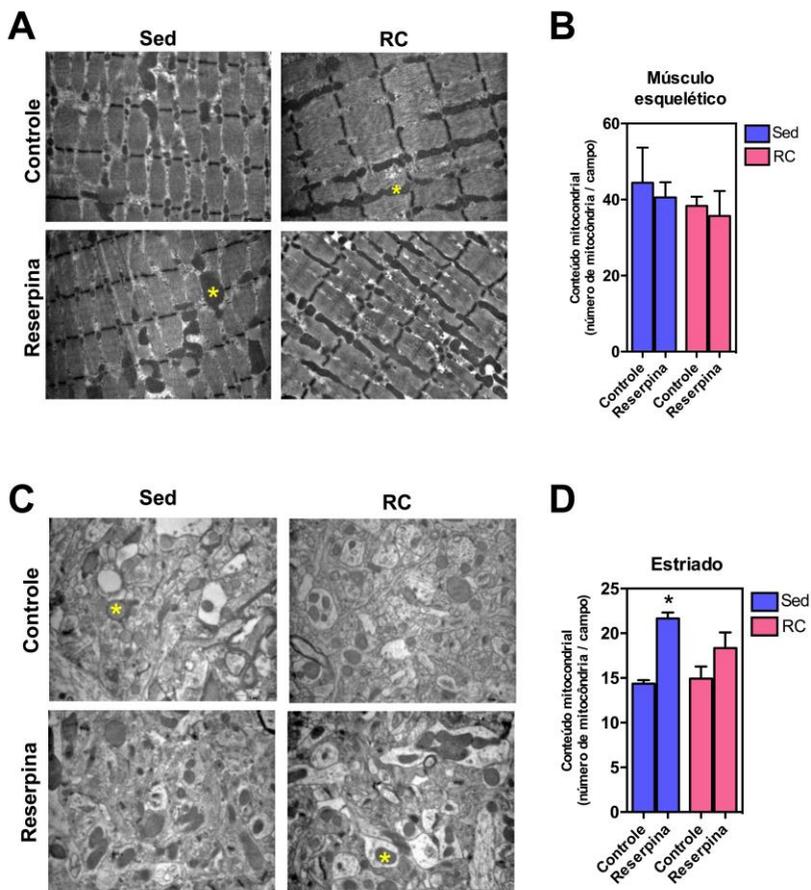


Figura 12: Efeito da administração de reserpina sobre o conteúdo mitocondrial em músculo esquelético e estriado de animais submetidos a atividade física voluntária em roda de correr. Camundongos Suíços machos tiveram livre acesso a roda de correr durante 14 dias, em seguida, foram aplicadas duas doses de reserpina (1 mg/kg) ou do seu veículo (ver Desenho Experimental I). Conteúdo mitocondrial do músculo esquelético quadríceps (A e B) e estriado (C e D). Localização mitocondrial representada pelo * em amarelo. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (3 animais por grupo). Sed: sedentário; RC: roda de correr. * $P < 0,05$ vs. grupo controle (teste t de Student).

5.3.6 Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA sobre o estado emocional e a nocicepção de camundongos Suíços machos

No Desenho Experimental IV duas administrações de reserpina (1mg/kg) foram realizadas com intervalo de 48h, sem intervenção com a roda de correr. Vinte e quatro horas após a administração de reserpina uma única dose de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg) foi administrada, e após 30min o nado forçado, *splash test* e o teste de *von Frey* foram avaliados, como ilustrado pela Figura 13A. A Figura 13 mostra que o comportamento tipo-depressivo (Figura 13B), a anedonia (Figura 13C) e a nocicepção (Figura 13D) não foram comprometidos pela administração de reserpina.

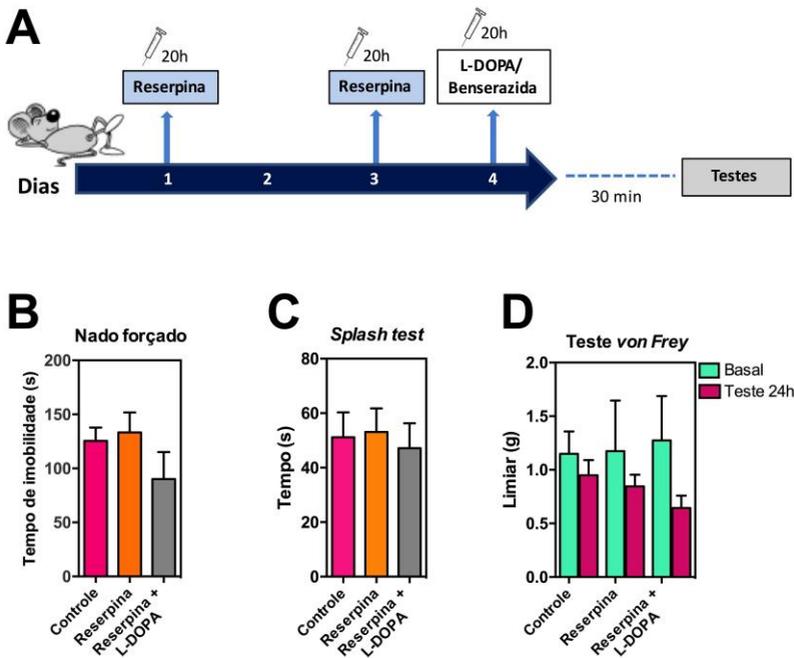


Figura 13: Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA sobre o estado emocional e a nocicepção de camundongos Suíços machos. Camundongos Suíços machos receberam duas administrações de reserpina (1mg/kg) realizadas com intervalo de 48h. Vinte e quatro horas após a administração de reserpina uma única dose de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg) foi administrada, e após 30 min os testes comportamentais foram

realizados (Desenho Experimental IV; A). Efeito da administração de reserpina sobre o nado forçado (B), *splash test* (B) e *vonFrey* (D). Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 2 experimentos (8 animais por grupo; ANOVA de uma via).

5.3.7 Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA sobre o sistema cardiovascular de camundongos Suíços machos

A Figura 14A-E mostram o efeito de duas doses de reserpina (1 mg/kg) e uma dose de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg) sobre o sistema nervoso simpático de camundongos suíços machos, acordo com o Desenho Experimental IV (Figura 13A). A Figura 14A mostra o traçado representativo do ECG. As Figuras 14B-E mostram que a administração de reserpina não comprometeu o traçado do ECG em 2h (Figura 14B) ou 20h (Figura 14C) após a administração de reserpina. Ainda, a administração de reserpina não alterou a taxa de registro (recording rate; RR) em 2h ou 20h (Figura 14D) e os batimentos cardíacos por minuto (bpm) nos mesmos tempos (Figura 14E).

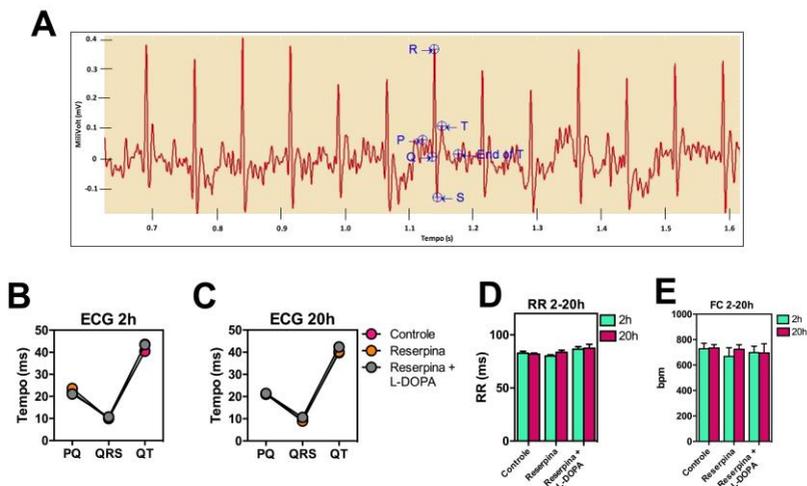


Figura 14: Efeito da administração de reserpina e/ou L-DOPA sobre o sistema cardiovascular de camundongos suíços machos. Camundongos Suíços machos receberam duas administrações de reserpina (1mg/kg) realizadas com intervalo de 48h. Vinte e quatro horas após a administração de reserpina uma única dose de L-DOPA/benserazida (100/50 mg/kg) foi administrada (ver Desenho Experimental IV). Efeito da administração de reserpina sobre o eletrocardiograma (A) 2h (B) e 20h (C), intervalo R-R (controle autônomo da

frequência cardíaca; FC) em 2h e 20h (D) e FC representada pelos batimentos cardíacos por minuto (bpm) em 2 e 20h (E). Os dados representam a média \pm erro padrão da média de 2 experimentos (8 animais por grupo; ANOVA de uma via).

5.3.8 Efeito da administração de reserpina *in vitro* sobre a viabilidade, metabolismo energético e respiração celular de miotubos L6

A Figura 15A mostra que o tratamento com reserpina não comprometeu a viabilidade celular em miotubos L6. A rotenona (inibidor com complexo I) foi utilizada como controle positivo do experimento. A Figura 15B mostra que a reserpina também não comprometeu o metabolismo glicolítico, não apresentando diferença significativa na liberação de lactato no sobrenadante de miotubos celulares. Ainda, a Figura 15C mostra que o consumo de oxigênio mitocondrial e a atividade da ATP sintase (Figura 15D) não foram prejudicados com a exposição a doses crescentes de reserpina.

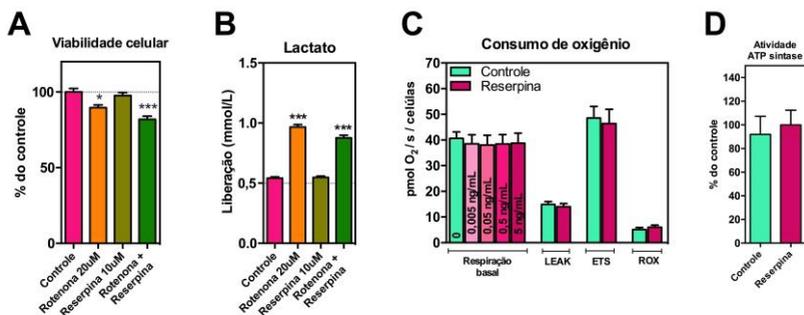


Figura 15: Efeito da administração de reserpina *in vitro* sobre a viabilidade, metabolismo energético e respiração celular de miotubos L6. Efeito da administração de reserpina *in vitro* sobre a viabilidade (A), produção de lactato (B), consumo de oxigênio mitocondrial (C) e atividade da ATP sintase (D) de miotubos L6. O tratamento com rotenona (20 μ M) foi utilizado como controle positivo. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ vs. grupo controle. O teste ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* de Bonferroni foi utilizado para os experimentos de viabilidade, lactato e consumo de oxigênio e o teste *t* de Student foi utilizado para a atividade da ATP sintase.

5.4 DISCUSSÃO

Estudos sobre os sintomas não motores da DP tem crescido exponencialmente nos últimos anos devido sua relação direta com o comprometimento da qualidade de vida dos pacientes (SHULMAN *et al.*, 2002; CHAUDHURI, HEALY e SCHAPIRA, 2006; FRIEDMAN, 2009; CHAUDHURI *et al.*, 2011). Apesar da alta prevalência de fadiga em pacientes com DP, o problema nem sempre é reconhecido clinicamente, devido ao caráter subjetivo e por ser pouco explorado (SHULMAN *et al.*, 2002). A etio/fisiopatologia da fadiga nesta população ainda é mal compreendida e a abordagem clínica é inexistente. Para melhor compreender os mecanismos da fadiga em pacientes com DP, empregamos um modelo experimental induzido pela administração repetida de reserpina (1 mg/kg), e para a restituição das concentrações fisiológicas de DA estriatais, administramos a L-DOPA.

Neste capítulo, mostramos que a L-DOPA restaura as concentrações dopaminérgicas no estriado de animais tratados com reserpina e atenua os sintomas de fadiga, caracterizado por uma melhora na distância percorrida na roda de correr e por um melhor desempenho no teste de esforço físico, sem envolvimento de fatores emocionais, nociceptivos ou metabólicos periféricos.

Sabe-se que a DA tem um papel fundamental na iniciação de movimentos involuntários e foi o primeiro neurotransmissor a ser investigado pelo seu potencial papel na fadiga (DAVIS e BAILEY, 1997). Dessa forma, acreditamos que os gânglios basais contribuam para a fatigabilidade central modulando circuitos dopaminérgicos envolvidos no controle do movimento (FOLEY e FLESHNER, 2008). Aqui foi demonstrado que a atividade física voluntária reverteu as concentrações de DOPAC e o efeito cataléptico induzido pela reserpina. Bliss e Ailion foram os primeiros a descrever o aumento do metabolismo da DA em cérebro total de roedores após atividade de corrida (BLISS e AILION, 1971). É provável que a atividade física regular influencie positivamente na capacidade em realizar exercício, melhorando a neurotransmissão da DA em áreas cerebrais com inervação dopaminérgica enriquecida (DAVIS e BAILEY, 1997).

Os neurônios dopaminérgicos estão sujeitos a modulação por uma variedade de fatores. Alguns dos fatores envolvidos na regulação dopaminérgica durante a atividade física incluem: os receptores D1 (receptor excitatório presente na via direta) e D2 (receptor inibitório presente na via indireta). Durante uma atividade física, os autoreceptores D2 podem potencialmente restringir a atividade da DA aumentando a condutância de K^+ , e por consequência, hiperpolarizando a célula. Isto

tornará menos provável a geração um potencial de ação, e, portanto, resultará numa via inibitória (ADELL e ARTIGAS, 2004). No entanto, um estudo demonstrou, que animais fisicamente ativos apresentaram reduções significativas no RNA mensageiro de D2 na região da SNpc, dessa forma, animais fisicamente ativos poderiam evitar a diminuição da atividade dopaminérgica durante a atividade física por uma redução na expressão de D2 (FOLEY e FLESHNER, 2008).

Ainda, Petzinger e colaboradores, observaram um aumento na liberação de DA no estriado, bem como, uma regulação negativa do transportador DAT (proteína responsável pela captação e remoção de DA do espaço extracelular) e tirosina hidroxilase em animais tratados com MPTP (toxina utilizada como modelo de DP por induzir neurodegeneração dopaminérgica) e que realizaram exercício em esteira por 28 dias (PETZINGER *et al.*, 2007).

Embora a associação de exercício físico e tratamento farmacológico em pacientes com DP seja escassa na literatura, existem alguns trabalhos clínicos que demonstram que a L-DOPA é mais eficiente que o placebo na redução da fadiga em pacientes com DP (LOU *et al.*, 2003a; LOU *et al.*, 2003b; SCHIFITTO *et al.*, 2008), o que sugere que a deficiência dopaminérgica pode estar envolvida na causa de fadiga.

Foi também identificado neste trabalho que animais que receberam reserpina e que tiveram as concentrações de DA restituídas pelo tratamento com L-DOPA, demonstraram um melhor desempenho físico. Estudos clínicos realizados em pacientes com DP, demonstraram que o metilfenidato (potente inibidor da recaptação de dopamina e noradrenalina) melhorou o escore de fadiga subjetiva em relação ao basal (KLUGER, KRUPP e ENOKA, 2013), resposta similar também foi encontrada com L-DOPA. Uma única dose de L-DOPA melhorou a produção de força gerada pelo músculo bíceps (LOU *et al.*, 2003b), bem como o índice de fadiga, calculado através de testes laboratoriais para fatigabilidade física (ZIV *et al.*, 1998). No entanto, este é o primeiro trabalho experimental que conhecemos, que investigou o papel da L-DOPA em animais com sinais de fadiga.

Para Davis e Bailey, a fadiga de origem central é desencadeada por uma alteração nas concentrações dos neurotransmissores 5-HT e DA no estriado (ver classificação de fadiga, página 39). Os autores sugerem que uma baixa relação 5-HT/DA no estriado favorece uma melhor performance física (DAVIS e BAILEY (1997). Aqui foi demonstrado que animais tratados com reserpina, apresentaram uma diminuição na distância percorrida na roda de correr, em concordância com um

aumento na relação dos neurotransmissores 5-HT/DA no estriado. Sabe-se que a ativação dos neurônios dopaminérgicos da SNpc leva a intensa liberação de DA para o estriado, que dá origem a duas saídas principais responsáveis pelo controle motor: a via direta e a via indireta (ver Figura 4) (LU, GHASEMZADEH e KALIVAS, 1998). Dessa forma, é plausível sugerir que um comprometimento no sistema dopaminérgico, o qual está envolvido diretamente no movimento, contribua para a fadiga central (FOLEY e FLESHNER, 2008).

Ainda, a hipótese aqui apresentada de fadiga central pode ser reforçada pelas baixas concentrações de lactato sanguíneo observado ao final do teste incremental. Em repouso a concentração de lactato é relativamente baixa (aproximadamente 1 mmol/L), porém com o aumento na intensidade do exercício ocorre um desequilíbrio entre a produção e remoção, com conseqüente acúmulo e aumento na concentração de lactato no sangue. Durante o exercício, o acúmulo de lactato e íons de H⁺ provenientes do metabolismo anaeróbico são considerados os principais causadores da fadiga muscular (CAPUTO *et al.*, 2009). Pinho e colaboradores demonstraram que o aumento na intensidade do exercício também está diretamente relacionado ao aumento nas concentrações de lactato, e que ratos saudáveis não treinados podem atingir valores de lactato próximos de 6 mmol/L em um teste de carga incremental (SIGWALT *et al.*, 2011; PINHO *et al.*, 2012). Tal fato nos leva a acreditar, que um prejuízo da neurotransmissão dopaminérgica pode reduzir a estimulação do córtex motor e recrutamento muscular insuficiente para a demanda mecânica, que por sua vez, pode influenciar na capacidade de realizar exercício físico, refletindo em um aumento significativamente menor nas concentrações de lactato.

A reserpina é um alcaloide isolado das raízes da planta *Rauwolfia serpentina*. Antigamente a reserpina era prescrita no tratamento da hipertensão por agir no sistema nervoso simpático pela depleção das concentrações de noradrenalina nos nervos simpáticos, causando vasodilatação e diminuição da frequência cardíaca. Sua utilização clínica foi suspensa, pois o uso crônico causava um estado de Parkinsonismo farmacológico reversível em seres humanos (DUTY e JENNER, 2011). No entanto, nossos resultados descartam a influência da reserpina sobre o sistema nervoso simpático de roedores na dose utilizada de 1mg/kg.

Foi a reserpina também, que deu o ponto de partida para o entendimento do papel da DA no SNC, principalmente nos núcleos da base, e sua relação com a DP, devido principalmente aos achados de

Carlsson e colaboradores, que observaram prejuízos motores em coelhos, os quais podiam ser revertidos pela administração de L-DOPA (CARLSSON, LINDQVIST e MAGNUSSON, 1957; DUTY e JENNER, 2011). A reserpina simula alguns sintomas motores da DP em roedores, como redução na atividade locomotora (TADAIESKY, ANDREATINI e VITAL, 2006), bradicinesia, rigidez muscular e tremor de repouso (DUTRA *et al.*, 2002), além de prejuízos cognitivos como prejuízo de memórias implícitas e operacionais (AGUIAR *et al.*, 2009), demência e depressão (KURTZ e PALFAI, 1977). Apesar de alguns estudos utilizarem a reserpina para modelo animal de depressão (BOLANDGHAMAT, MOGHIMI e IRANSHAHI, 2011; FATTAHIAN *et al.*, 2016), os sintomas são dependentes da dose utilizada. Os achados deste trabalho mostram que o menor desempenho encontrado no grupo reserpina não esteve relacionado com comportamento tipo depressivo (teste nado forçado), o qual foi comprovado também pelas concentrações normais de 5-HT. Ainda, a depleção de DA causada pela administração de reserpina, não induziu sintomas de anedonia (*splash test*), nem alterou os reflexos nociceptivos (teste von Frey).

Sabe-se que a reserpina compromete as concentrações de DA por ser um inibidor do VMAT2 (NAUDON *et al.*, 1996). No entanto, estudos mais recentes têm demonstrado que a reserpina pode também diminuir o número de neurônios dopaminérgicos (SANTOS *et al.*, 2013). Lee e colaboradores verificaram que o tratamento com reserpina bloqueou a autofagia e aumentou as concentrações da proteína α -sinucleína, o que pareceu contribuir para a morte neuronal (LEE *et al.*, 2015). Em adição, Shukla et al. observaram uma diminuição na respiração mitocondrial, bem como na atividade da ATP sintase em mitocôndrias isoladas de cérebro total de ratos tratados com 2,5 mg/kg de reserpina (SHUKLA, DAVE e KATYARE, 2000). Em pacientes, numerosas evidências demonstraram que a disfunção mitocondrial (SCHAPIRA *et al.*, 1989), estresse oxidativo (TSANG e CHUNG, 2009), agregação de proteínas, apoptose (MATTSON, 2000), neuroinflamação (TANSEY, MCCOY e FRANK-CANNON, 2007) e excitotoxicidade glutamatérgica (RODRIGUEZ, OBESO e OLANOW, 1998) parecem estar envolvidas na patogenia da doença. A relação direta entre disfunção mitocondrial e DP veio a partir da descrição da deficiência do complexo I na SNpc em autopsias de córtex frontal em pacientes com DP (SCHAPIRA *et al.*, 1989; SCHAPIRA, 2008). Sabe-se que a deficiência ou inibição parcial do complexo I resulta em aumento da produção mitocondrial das ERO, aumento no estresse

oxidativo e danos celulares irreversíveis (para revisão ver LATINI *et al.* (2012). Aqui, nós sugerimos que o aumento no conteúdo mitocondrial encontrado no estriado, ocorreu devido a um mecanismo de adaptação mitocondrial, conhecido como fissão, onde mitocondrias disfuncionais se fragmentam para atender a necessidades energéticas regionais (TWIG *et al.*, 2008). Neste contexto, a atividade física voluntária preveniu este aumento.

Dessa forma, nossos dados sugerem, que o baixo desempenho de animais tratados com reserpina parece estar principalmente ligado a fadigabilidade de origem central. A fadigabilidade é associada com fatores periféricos (por exemplo, depleção do conteúdo de glicogênio, depleção energética, deficiência mitocondrial, entre outros, no músculo e nervos) e centrais (circuitos corticais e subcorticais disfuncionais), todos os quais estão associados com uma diminuição no desempenho físico (LOU, 2009). Dentre os fatores periféricos, nós não observamos diferenças significativas no conteúdo mitocondrial do músculo quadríceps (principal músculo requerido durante a corrida), bem como, não foram observadas alterações na viabilidade celular, na liberação de lactato, no consumo de oxigênio mitocondrial e na atividade da ATP sintase de miotubos L6 expostos a reserpina, sugerindo que a reserpina não alterou o metabolismo energético do músculo esquelético. Dessa forma, estes resultados descartam qualquer efeito periférico *per se* induzidos pela reserpina no desempenho físico.

5.5 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que os sintomas de fadiga podem ser causados por um prejuízo na neurotransmissão dopaminérgica no estriado, indicando um sintoma não motor de origem central. Em adição, nossos resultados podem indicar que (I) uma deficiência nas concentrações de DA leva a sintomas de fadiga em um modelo de DP experimental; (II) o tratamento com L-DOPA reduz os sintomas de fadiga nos protocolos de atividade física voluntária e forçada; e (III) fatores periféricos ou emocionais não parecem influenciar diretamente os sintomas de fadiga no modelo experimental de DP induzido pela reserpina.

6. CAPÍTULO II: PAPEL DA TETRAHIDROBIOPTERINA NOS MECANISMOS DE NOCICEÇÃO EM MODELO ANIMAL DE ARTRITE REUMATOIDE

Neste capítulo, mostraremos a inibição da via de síntese da BH4 através do inibidor da sepiapterina redutase, SPRI3 (ver Figura 16), e a associação com os sintomas de nociceção em animais tratados com um coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA; modelo animal de AR).

O SPRI3 é um composto novo e ainda pouco explorado, mas seu efeito sobre a hipersensibilidade a dor neuropática já tem sido descrito pelo nosso grupo de pesquisa (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

Os resultados apresentados neste Capítulo foram realizados durante meu Doutorado Sanduíche no Laboratório Woolf, Departamento de Neurobiologia, Kirby Neurobiology Center, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Estados Unidos.

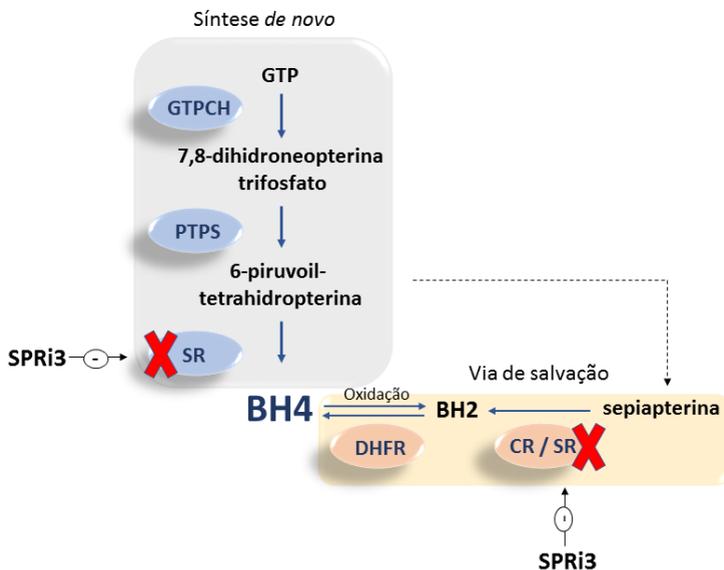


Figura 16: Representação esquemática da inibição da enzima SR pelo inibidor SPRI3. A manutenção das concentrações intracelulares de BH4 ocorre por meio das vias de síntese *de novo*, de salvaguarda e de reciclagem. São mostradas aqui as vias *de novo* e de salvaguarda onde o SPRI3 inibe a SR,

reduzindo a formação de BH₄ e acumulando o intermediário metabólico sepiapterina. BH₂, dihidrobiopterina; BH₄, tetrahidrobiopterina; CR, carbonil redutase; DHFR, dihidrofolato redutase; GTP, guanosina trifosfato; GTPCH, guanosina trifosfato ciclohidrolase I; PTPS, 6-piruvil tetrahidrobiopterina sintase; SR, sepiapterina redutase.

6.1. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c machos adultos (± 25 g) obtidos do Laboratório *Jackson* (Estados Unidos), e acondicionados no *ARCH, Karp Building, Boston Children's Hospital e Harvard Medical School*, Boston, Estados Unidos. Os animais permaneceram sob um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas, a uma temperatura ambiental de aproximadamente 22 ± 1 °C, com acesso livre à água e ração para roedores. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê do Uso e Cuidado com Animais do *Boston Children's Hospital* (16-01-3082).

6.1.2. Modelo experimental de artrite reumatoide induzida por um coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA)

Para indução do modelo de artrite reumatoide experimental, conforme descrito por Khachigian (KHACHIGIAN, 2006), cada animal recebeu uma injeção i.p com um coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (*collagen 5 clone cocktail*; 1,5 mg/animal; Chondrex, USA) no dia 1. No dia 4 foi administrada uma injeção de LPS (50µg/animal) para indução do CAIA, ver Figura 17. Os animais controle receberam uma injeção de solução cloreto de sódio 0,9% (veículo) no dia 1 e a injeção de LPS no dia 4. Todas as soluções foram injetadas no volume de 0,1mL por cada 10g de massa corporal. A partir do dia 7 o escore clínico foi avaliado diariamente (ver descrição no item 6.1.6.1). Este modelo induz duas fases definidas pelos escores clínicos. Uma primeira fase inflamatória aguda caracterizada por inchaço das articulações, com duração do dia 4 ao 25 após a injeção do coquetel. E outra fase crônica, com duração do dia 25 ao 50, onde o inchaço e a inflamação desaparecem e os escores clínicos retornam aos valores normais, no entanto, a dor persiste.



Figura 17: Representação esquemática da indução do modelo experimental de artrite reumatoide caracterizada por dor inflamatória induzida por um coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA) administrado no dia 1, e a administração de LPS 50 μ g/animal para ativação do anticorpo no dia 4. O CAIA apresenta duas fases: aguda (entre os dias 4-25) e crônica (entre os dias 25-50).

6.1.3. Tratamento com o inibidor da sepiapterina redutase

A hipersensibilidade a dor é caracterizada pelo aumento da sensibilidade a estímulos mecânicos e térmicos em ambas as fases do modelo. Assim, com o intuito de verificar o efeito da produção de BH4 sobre a dor inflamatória, nós administramos o composto SPRi3, inibidor da SR. O inibidor foi desenvolvido pelo laboratório do Prof. Dr. Clifford Woolf junto ao Dr. Kai Johnsson da Suíça (*Institute of Chemical Sciences and Engineering, Laboratory of Protein Engineering; LPI*).

O SPRi3 foi administrado nos dias 8 e 10 na fase aguda e 45 e 47 na fase crônica do modelo, na dose de 300mg/kg (i.p). Esta dosagem já tem sido mostrada ser analgésica em modelo de dor neuropática (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). Naproxeno 30mg/kg (i.p) foi utilizado como controle positivo.

O inibidor foi diluído em ciclodextrina 50% (veículo) e um volume de 0,1mL por cada 10g de massa corporal foi injetado. Os animais do grupo controle receberam igual volume de veículo.

6.1.4. Tratamento com o inibidor de macrófagos

Com o intuito de verificar o envolvimento dos macrófagos para a produção de BH4, o fármaco clodronate (o qual elimina macrófagos por apoptose) foi administrado no dia 10 da fase aguda e 35 da fase crônica, na dose de 0,84mg/kg (i.p) (YOU *et al.*, 2013). O fármaco foi injetado em um volume de 0,1mL por cada 10g de massa corporal. Os animais do grupo controle receberam igual volume de cloreto de sódio 0,9% (veículo).

6.1.5. Procedimentos e análises

Tanto a experimentação quanto as análises comportamentais e bioquímicas foram realizadas durante meu Doutorado Sanduíche (09/2015 a 08/2016) no Departamento de Neurobiologia, *Kirby Neurobiology Center, Boston Children's Hospital, Harvard Medical School*, Boston, Estados Unidos, sob coordenação do Dr. Clifford Woolf e supervisão do Dr. Nick Andrews.

6.1.6. Avaliações comportamentais

Em todos os testes comportamentais os animais foram transportados para ambientação à sala de experimentos climatizada, uma hora antes do início das tarefas comportamentais, as que foram realizadas durante a fase clara do ciclo do roedor.

6.1.6.1 *Escore clínico*

Os sinais de artrite foram avaliados de acordo com uma escala de 4 pontos para cada pata do animal e as pontuações para cada uma das quatro patas foram somadas para dar uma pontuação máxima de 16 (KHACHIGIAN, 2006; BAS *et al.*, 2012).

Tabela 2: Escore utilizado para avaliar os sinais de artrite.

Escore	Sinais de artrite
0	normal
1	um dedo do pé inflamado e inchado
2	inchaço em mais de uma articulação
3	pata inteira inflamada e inchada
4	pata muito inflamada e inchada

O valor do escore de artrite variou entre 0 e 4 para cada pata. Adaptado de KHACHIGIAN (2006).

6.1.6.2 *Teste de von Frey*

A dor foi avaliada através da alodinia mecânica com o teste de von Frey. Descrição do teste se encontra no item 5.1.7.5 do Capítulo I.

6.1.6.3 *Teste Hargreaves*

A dor ao calor radiante foi avaliada através da alodinia térmica com o teste de Hargreaves. Neste teste, os animais foram colocados em uma câmara de acrílico com fundo e lados transparentes, onde permaneceram durante 30min antes do teste. Após, um feixe de luz previamente estabelecido foi incidido abaixo do fundo transparente e

posicionado sob a pata traseira do animal. A hiperalgesia ao calor foi caracterizada como a retirada da pata do animal dentro do tempo máximo de 30s, objetivando delimitar o limiar térmico basal (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

6.1.7. Coleta das amostras

6.1.7.1 Amostras de urina

As amostras de urina foram coletadas na indução do modelo (dia 1) e, em seguida, nos dias 8, 14, 21, 28, 35 e 45 após a indução do CAIA no período da manhã. Os animais foram colocados em um acrílico com divisórias sobre a plataforma utilizada para o teste de von Frey e uma folha de plástico não absorvente foi posicionada abaixo. Ao longo de um período de aproximadamente 1h os animais urinaram voluntariamente na folha de plástico e a urina foi recolhida com uma pipeta e armazenada em microtubos que foram colocados imediatamente em gelo seco e posteriormente mantidos em freezer -80°C até a análise.

6.1.8. Mensurações bioquímicas

6.1.8.1 Quantificação de sepiapterina

As amostras de urina foram centrifugadas a $16.000 \times g$ durante 10min a 4°C e diluídas em fase móvel. As concentrações de sepiapterina presentes no sobrenadante foram determinados por HPLC acoplado ao detector de fluorescência. Dez microlitros foram injetados no sistema de HPLC. A análise foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa Sigma Discovery C-18 5 μm (10 x 2,1 mm), com um fluxo de 0,200 mL/min e uma eluição isocrática de 85% de tampão fosfato 15 mM e 15 % de acetonitrila, pH 6,4. O sistema de HPLC da *Beckman Coulter Inc.*, incluía um Módulo de Distribuição de Solvente Modelo 125 e um *Autosampler* Modelo 508, controlado através do 32 *Software Karat* 8.0. O detector de fluorescência (*Waters 2475*) foi ajustado para uma excitação de 425nm e uma emissão de 530nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mol}$ creatinina.

6.1.8.2 Quantificação de BH4

As amostras de urina foram precipitadas pela adição de um volume de ácido tricloroacético 5%, contendo ditioeritritol 6,5mM (DTE). As amostras foram centrifugadas a $16.000 \times g$ durante 10min a 4°C. As concentrações de BH4 presentes no sobrenadante foram determinados por HPLC acoplado ao detector eletroquímico. Dez microlitros foram injetados no sistema de HPLC. A análise foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa *Waters Atlantis* dC-18 5 μm (4,6 x

250mm), com um fluxo de 0,60 mL/min e uma eluição isocrática de 6,5mM de NaH₂P0₄, 6mM de ácido cítrico, 1mM octil sulfato de sódio, ácido dietilenotriaminopentaacético 2,5mM DTE, 160uM e 12% de acetonitrila, pH 3,0. O sistema de HPLC da *Beckman Coulter Inc.*, incluía um Módulo de Distribuição de Solvente Modelo 125 e um *Autosampler* Modelo 508, controlado através do 32 *Software Karat 8.0*. O detector eletroquímico (Thermo Scientific - Dionex Coulochem III) com células eletroquímicas de dois sensores foi ajustado para +50 e +450mV. O canal de +450mV proporcionou a resposta mais sensível para a medição da BH4. Os resultados foram expressos em µmol/mol creatinina.

6.1.8.3 *Quantificação de creatinina*

As concentrações de creatinina presentes na urina foram determinadas usando um kit comercial (Pointe Scientific Inc., Canton, Michigan, Estados Unidos) e seguindo as recomendações técnicas do fabricante.

6.2. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram expressos em média ± EPM. A análise inferencial da estatística foi realizada na maioria dos desenhos experimentais, através de análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni, quando os valores de *F* foram significativos. Para comparações entre dois grupos de amostras pareadas ou independentes utilizou-se o teste *t* de Student.

As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$ (IC=95%). As análises estatísticas e gráficos foram realizados através do programa GraphPad Prisma 6®.

6.3. RESULTADOS

6.3.1. **Caracterização do modelo de artrite reumatoide induzido pela administração de um coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA) em camundongos Balb/c adultos**

Inicialmente foi realizada a caracterização do modelo animal de artrite reumatoide induzido pela administração do coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA), seguido da administração de LPS. Pode-se observar na Figura 18A, que os animais com artrite reumatoide apresentaram uma redução acentuada no peso corporal durante a fase aguda ($P < 0,001$), caracterizada por um cenário inflamatório, quando comparado aos animais controles. Na fase crônica, os animais do grupo CAIA recuperaram a massa corporal, igualando ao grupo controle.

A Figura 18B mostra, que nos animais do grupo CAIA a fase aguda também foi acompanhada de inchaço nas articulações das patas ($P < 0,001$), observada pelos altos valores no escore de artrite, característica não observada na fase crônica.

Ainda, na Figura 18C podemos observar a evolução no processo de inchaço (inflamação) de uma das patas traseira durante a fase aguda. Os dias 8 e 10 representaram o pico no processo de inchaço, e a resolução ocorreu após o dia 21.

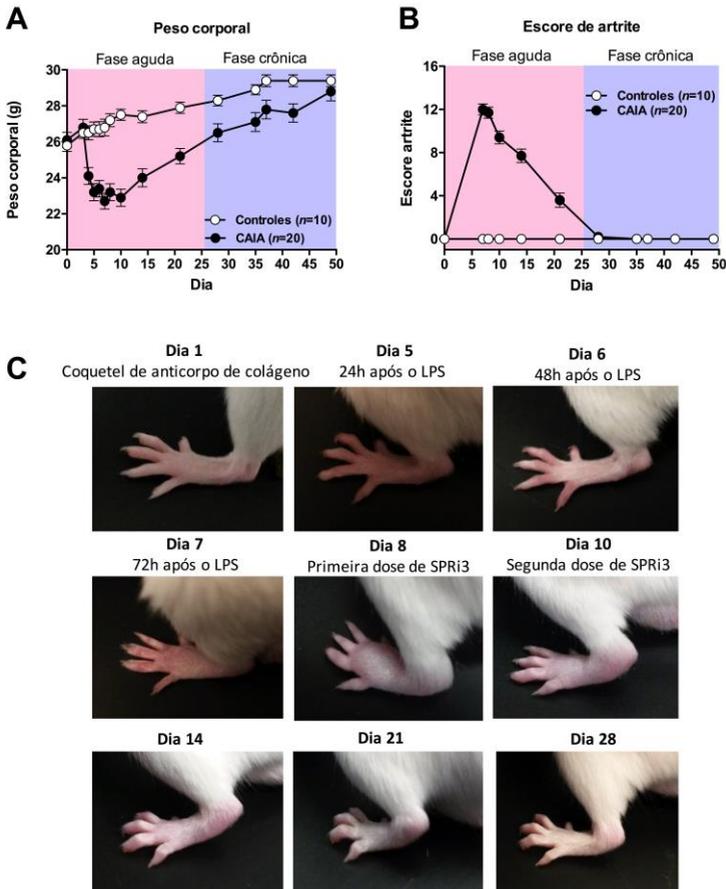


Figura 18: Caracterização do modelo de artrite reumatoide induzido pela administração de um coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II em camundongos Balb/c adultos. Peso corporal (A), escore de artrite (B) e

representação fotográfica da pata traseira (C) nas fases aguda e crônica do modelo animal de artrite reumatoide induzido pela administração do coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA; 1,5mg por animal, i.p) acompanhado da administração de LPS (50ug por animal, i.p). Os dados representam média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

6.3.2. Efeito do inibidor SPRI3 sobre a nocicepção na fase aguda do modelo CAIA

A Figura 19 mostra o efeito do tratamento com o SPRI3, sobre os parâmetros de alodinia mecânica (vonFrey) e térmica (Hargreaves) nos dias 8 e 10, respectivamente, no modelo CAIA, como ilustrado na Figura 19A. Estes dias foram escolhidos por apresentarem um maior inchaço das articulações durante a fase aguda, como mostrado na Figura 18C.

Os testes comportamentais foram realizados pré e 1h após a administração do inibidor SPRI3. O tempo de 1h foi escolhido baseado em trabalho anterior do nosso grupo onde o composto apresentou maiores efeitos sobre a hipersensibilidade (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

Como esperado, o grupo CAIA apresentou maior sensibilidade no tempo 0h (basal) nos testes de vonFrey ($P < 0,001$; Figura 19B) e Hargreaves ($P < 0,001$; Figura 19C e Figura 19D), comparado aos animais do grupo controle.

A Figura 19B mostra que não foi observada diferença significativa após o tratamento com SPRI3 para alodinia mecânica (vonFrey). No entanto, a Figura 19C mostra que o SPRI3 diminuiu a hipersensibilidade térmica [$F_{(3,57)}=7,56$; $P < 0,01$] 1h após a administração do inibidor.

Para confirmar a eficácia do teste Hargreaves, foi utilizado como controle positivo o naproxeno; fármaco aprovado e usado no tratamento da dor ou inflamação causada por artrite; o qual foi administrado no dia 12, ainda no pico da inflamação da fase aguda [$F_{(3,27)}=5,08$; $P < 0,01$].

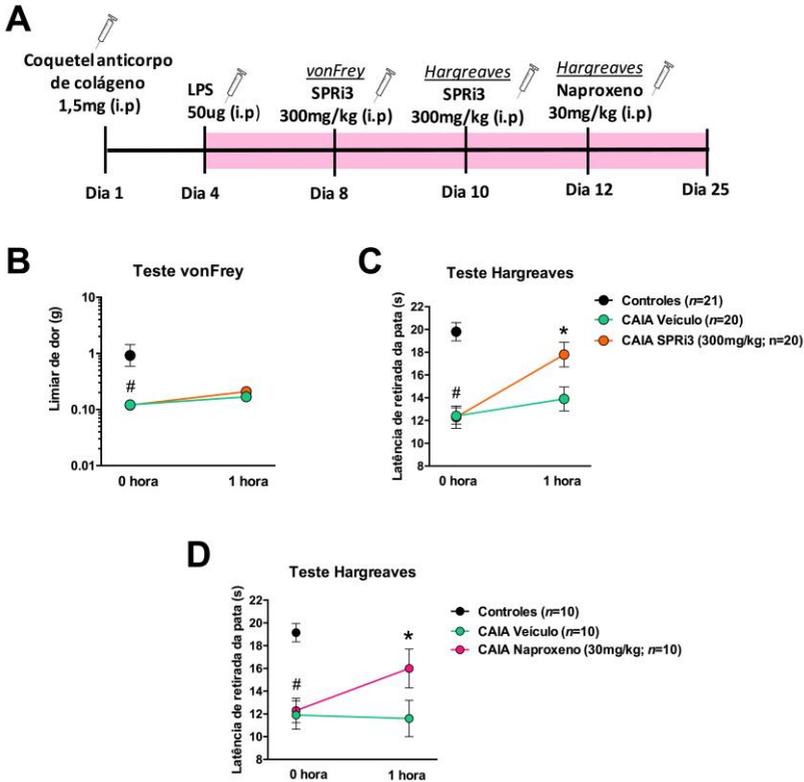


Figura 19: Efeito do inibidor SPRI3 sobre a nociceção na fase aguda do modelo CAIA. Representação esquemática da indução do modelo experimental de artrite reumatoide caracterizada por dor inflamatória induzida por um coquetel de CAIA administrado no dia 1 e LPS 50µg/animal no dia 4, bem como os dias de realização dos testes comportamentais e da administração do composto SPRI3 (A), teste comportamental para alodinia mecânica (B; von Frey) e alodinia térmica (C; Hargreaves) pré e 1h após administração de SPRI3 (300mg/kg) e do controle positivo naproxeno (D). Os dados representam média \pm erro padrão da média. # $P < 0,001$ vs. grupo controle (teste *t* de Student), * $P < 0,01$ vs. 0h (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

6.3.3. Efeito do inibidor SPRI3 sobre as concentrações de BH4 e sepiapterina urinária na fase aguda do modelo CAIA

A Figura 20 mostra o efeito do inibidor SPRI3 sobre a produção de sepiapterina e BH4 em urina de animais na fase aguda do modelo

CAIA. Ambos compostos foram analisados pré e 1h após o tratamento com o inibidor.

A Figura 20A mostra que as concentrações basais de BH4 (0h) foram significativamente maiores nos animais do grupo CAIA quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$), estando de acordo com a fase aguda inflamatória. Ainda, a administração de SPRi3 reduziu as concentrações de BH4 na urina 1h após ($P < 0,05$).

A Figura 20B mostra que a sepiapterina, biomarcador para monitorar a inibição da SR, aumentou nas amostras de urina 1h após a administração de SPRi3 ($P < 0,0005$).

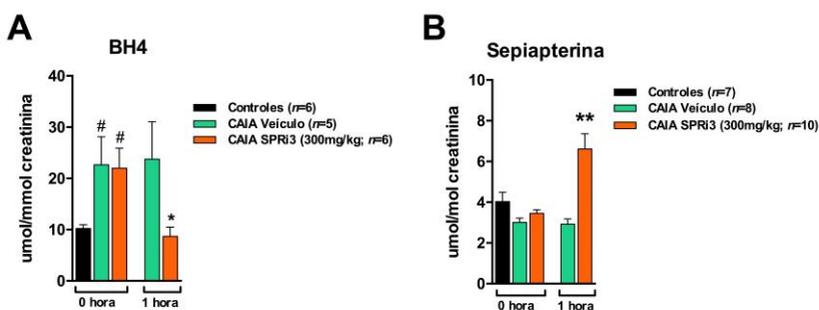


Figura 20: Efeito do inibidor SPRi3 sobre as concentrações de BH4 e sepiapterina urinária na fase aguda do modelo CAIA. Concentração de BH4 (A) e sepiapterina (B) urinária pré e pós administração de SPRi3 (300mg/kg). Os dados representam média \pm erro padrão da média. [#] $P < 0,05$ vs. grupo controle; ^{*} $P < 0,05$ e ^{**} $P < 0,0005$ vs. grupo CAIA veículo 1h (teste *t* de Student).

6.3.4. Efeito do inibidor SPRi3 sobre a nociceção na fase crônica do modelo CAIA

Na fase crônica, caracterizada pelo desaparecimento total do inchaço nas articulações das patas, os testes comportamentais para alodinia mecânica e térmica foram realizados nos dias 45 e 47, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 21A. Resultados similares foram encontrados aos observados na fase aguda do modelo.

A Figura 21 mostra que a hipersensibilidade ainda permanece no grupo CAIA no tempo 0h (basal) nos testes de vonFrey ($P < 0,0001$; Figura 20B) e Hargreaves ($P < 0,0001$; Figura 21C), comparado aos animais do grupo controle.

Ainda, a Figura 21B mostra que a administração de SPRi3 não apresentou diferenças significativas para alodinia mecânica, no entanto, a Figura 21C mostra que o SPRi3 reduziu a hipersensibilidade térmica 1h após a administração do inibidor [$F_{(3,39)}=17,67$; $P < 0,0001$].

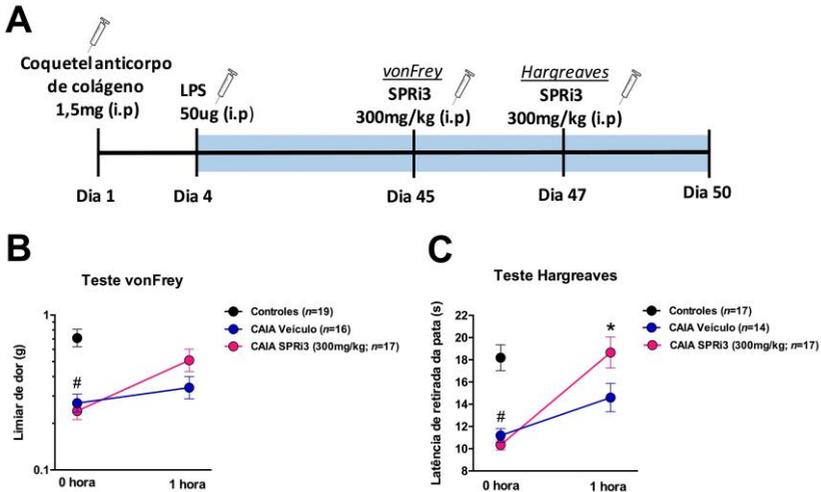


Figura 21: Efeito do inibidor SPRi3 sobre a nociceção na fase crônica do modelo CAIA. Representação esquemática da indução do modelo experimental de artrite reumatoide caracterizada por dor inflamatória induzida por um coquetel de anticorpo de colágeno anti-tipo II (CAIA) administrado no dia 1 e LPS 50µg/animal no dia 4, bem como os dias de realização dos testes comportamentais e da administração do composto SPRi3 (A), teste comportamental para alodinia mecânica (B; von Frey) e alodinia térmica (C; Hargreaves) pré e pós administração de SPRi3 (300mg/kg). Os dados representam média \pm erro padrão da média. # $P < 0,0001$ vs. grupo controle (teste *t* de Student), * $P < 0,0001$ vs. 0h (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni).

6.3.5. Efeito do inibidor SPRi3 sobre as concentrações de BH4 e sepiapterina urinária na fase crônica do modelo CAIA

A Figura 22 mostra o efeito do inibidor SPRi3 sobre a produção de sepiapterina e BH4 em urina de animais na fase crônica do modelo CAIA. Ambos compostos foram analisados pré e 1h após o tratamento com o inibidor.

A Figura 22A mostra que as concentrações de BH4 encontradas na fase crônica do modelo não mostram evidências de inflamação no grupo CAIA. No entanto, a administração de SPRi3 reduziu as concentrações de BH4 1h após sua administração ($P < 0,05$), demonstrando a eficácia do inibidor em bloquear a via metabólica da BH4, na qual também foi confirmada pelo aumento nas concentrações de sepiapterina em urina 1h após a administração ($P < 0,005$), mostrado pela Figura 22B.

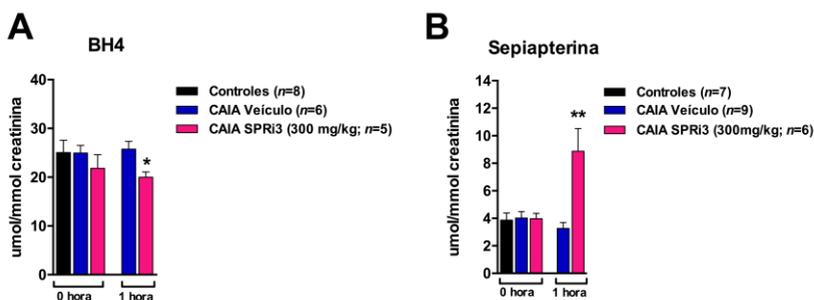


Figura 22: Efeito do inibidor SPRi3 sobre as concentrações de BH4 e sepiapterina urinária na fase crônica do modelo CAIA. Concentração de BH4 (A) e sepiapterina (B) urinária pré e pós administração de SPRi3 (300mg/kg). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,005$ vs. grupo CAIA veículo 1h (teste *t* de Student).

6.3.6. Perfil das concentrações de sepiapterina urinária durante as fases aguda e crônica do modelo CAIA

A Figura 23 mostra as concentrações de sepiapterina urinária mensuradas semanalmente entre os tratamentos com SPRi3 na fase aguda (dias 8, 14 e 21) e na fase crônica (dias 28, 35 e 45) do modelo CAIA.

Podem ser observados na Figura 23A que o inibidor foi administrado nos dias 8 (fase aguda) e 45 (fase crônica). A Figura 23B mostra um aumento nas concentrações do biomarcador sepiapterina somente nos dias em que o SPRi3 foi administrado ($P < 0,05$).

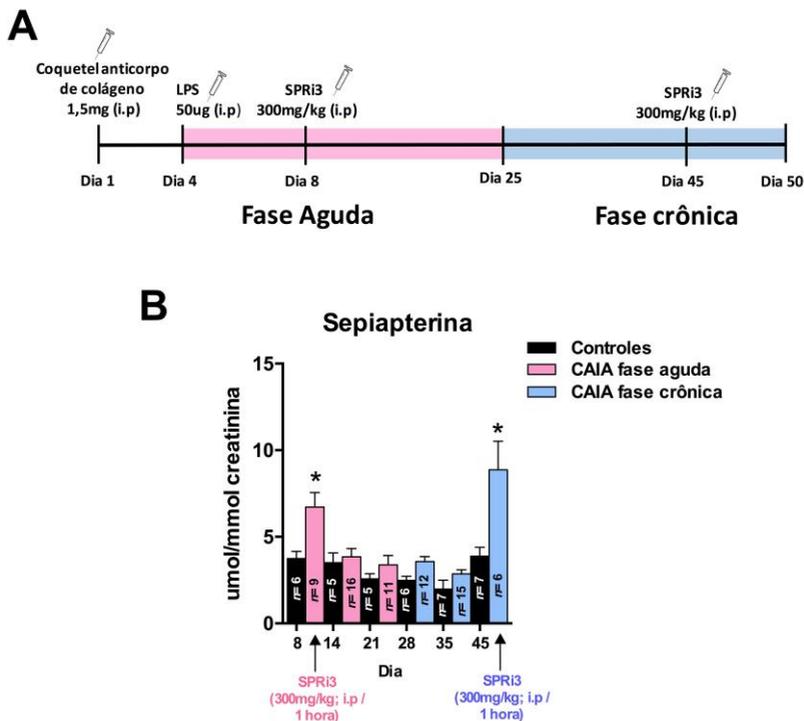


Figure 23: Perfil das concentrações de sepiapterina urinária durante as fases aguda e crônica do modelo CAIA. Representação esquemática dos dias em que o inibidor SPRI3 foi administrado (A) e concentração de sepiapterina (B) urinária, durante as fases aguda e crônica do modelo CAIA. Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. grupo controle do mesmo dia (Teste t de Student).

6.3.7. Efeito do inibidor clodronate sobre a nocicepção e concentração de BH4 urinária no modelo CAIA

Para identificar a contribuição dos macrófagos na síntese de BH4 e na hipersensibilidade térmica induzida pelo modelo CAIA, nós realizamos o modelo experimental novamente e nos dias 10 (fase aguda) e 35 (fase crônica) uma dose de 0,84 mg/kg de clodronate foi administrada, como ilustrado na Figura 24A.

A Figura 24B mostra que a inibição dos macrófagos reduziu a hipersensibilidade térmica 7 dias após a administração do inibidor na

fase aguda [$F_{(11,33)}=14,15$; $P < 0,001$], acompanhada de uma diminuição nas concentrações de BH4 ($P < 0,05$). Similar efeito foi observado na fase crônica, no entanto, neste caso, o efeito permaneceu até 10 dias após a administração [$F_{(11,33)}=14,15$; $P < 0,001$].

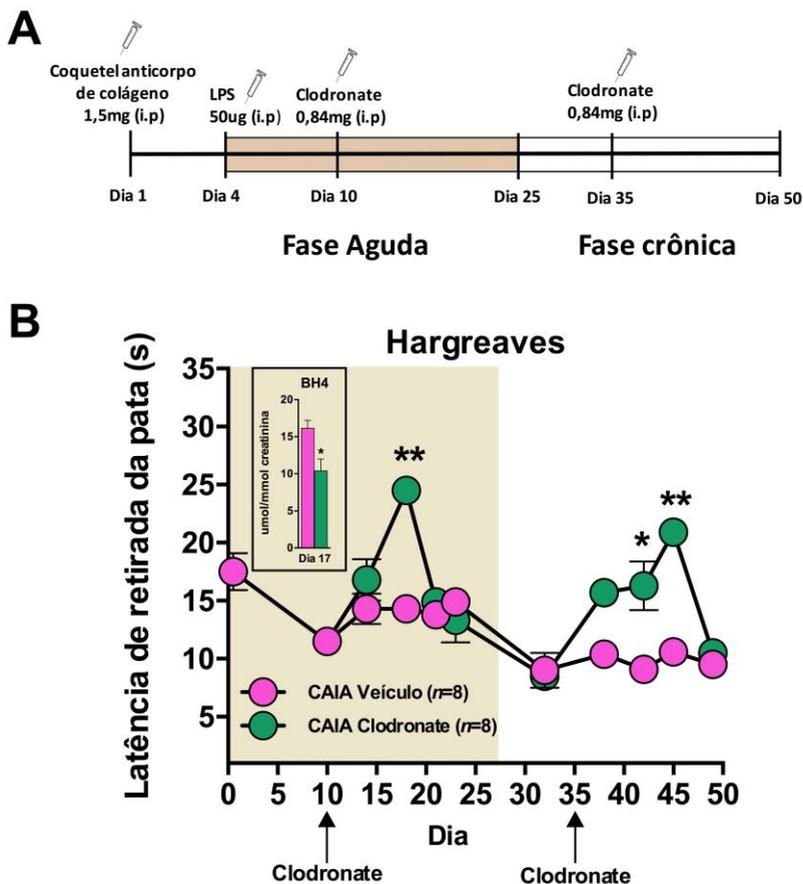


Figure 24: Efeito do inibidor clodronate sobre a nocicepção e concentração de BH4 urinária no modelo CAIA. Representação esquemática dos dias de administração do clodronate (A) e de realização do teste para alodinia térmica (B; Hargreaves), durante as fases aguda e crônica do modelo CAIA e concentração de BH4 em urina durante a fase aguda. Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,001$ vs. grupo CAIA veículo

(Hargreaves: ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Bonferroni; BH4: Teste *t* de Student).

6.4. DISCUSSÃO

Neste capítulo, foi demonstrado que o inibidor SPRI3 reduziu a hipersensibilidade a dor térmica, a qual foi acompanhada de uma redução nas concentrações de BH4 e aumento de sepiapterina urinária, em modelo animal de AR.

Em humanos, a ligação entre BH4 e dor foi descoberta através da identificação de um polimorfismo na enzima GTPCH (enzima limitante na síntese *de novo* da BH4). O efeito deste haplótipo foi associado com redução na dor, diminuição na transcrição do gene GTPCH e produção de BH4 (TEGEDER *et al.*, 2006; COSTIGAN, LATREMOLIERE e WOOLF, 2012). Estudos com animais também já demonstraram que após a lesão do nervo ciático, os neurônios sensoriais periféricos dos gânglios da raiz dorsal exibem um aumento na expressão do gene que codifica para GTPCH, do conteúdo proteico e da atividade desta enzima, e como consequência, um aumento nas concentrações locais de BH4 (TEGEDER *et al.*, 2006; LATREMOLIERE e COSTIGAN, 2011). Por outro lado, estudos utilizando um inibidor da enzima GTPCH (DAHP; 2,4-diamino-6-hidroxipirimidine), o qual é seletivo, porém com pouca potência, demonstraram uma diminuição nas concentrações de BH4 e analgesia em roedores com lesão do nervo ciático, confirmando a ação pró-nociceptiva do excesso da produção de BH4 no sistema somatossensorial (TEGEDER *et al.*, 2006). No entanto, uma vez que a enzima GTPCH é obrigatória na via de síntese *de novo* da BH4, a sua inibição reduziria cumulativamente as concentrações de BH4 à medida que os metabólitos nas vias de salvação e reciclagem fossem sendo utilizados (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

Nesse sentido, nosso grupo de pesquisa em parceria com o Laboratório do Prof. Clifford Woolf tem estudado a participação do metabolismo da BH4 nos processos de nociceção através da inibição da enzima SR, responsável pela conversão final de compostos intermediários em BH4 nas vias de *síntese de novo* e salvação (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). O SPRI3 inibe parcialmente a síntese de BH4, mantendo as concentrações normais no cérebro, visto que é um cofator obrigatório para a produção de mediadores com relevante fisiologia, como as aminas biogênicas neurotransmissoras, DA e 5-HT, e do ON (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). Outra vantagem, é que a inibição da enzima SR ainda permite uma produção considerável

de BH4 através de enzimas inespecíficas como a AR e/ou CR através da via de salvação (BLAU, BONAFE e THONY, 2001).

Tem sido demonstrado que a administração sistêmica do inibidor SPRI3 reduz a dor crônica através da diminuição nas concentrações de BH4 sem desenvolver tolerância ou efeitos adversos (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). No entanto, os efeitos do composto SPRI3 em um modelo de inflamação sistêmica, como no modelo de artrite reumatoide induzido pelo CAIA, ainda não havia sido estudado.

Até o momento, a SSZ é o tratamento aprovado para as doenças inflamatórias como artrite reumatoide e colite ulcerativa, e, mais recentemente, foi demonstrado que a SSZ e um de seus metabólitos, a sulfapiridina, também atuam inibindo a enzima SR (CHIDLEY *et al.*, 2011), e tem sido proposto que a inibição da BH4 contribui para a atividade anti-inflamatória da SSZ e a redução da hipersensibilidade a dor (HARUKI *et al.*, 2013; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). No entanto, o metabolismo complexo da SSZ, desfavorece uma relação direta entre as concentrações de BH4 e o comportamento de dor reduzido (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

Nossos resultados demonstraram uma associação entre redução da hipersensibilidade a dor térmica e diminuição na síntese de BH4, tanto na fase aguda como na fase crônica do modelo, indo ao encontro de outros trabalhos que encontraram similar resultado em modelo de dor neuropática e inflamatória (TEGEDER *et al.*, 2006; LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). No entanto, nós não observamos efeito do SPRI3 sobre a hipersensibilidade a dor mecânica. Tal achado, pode estar relacionado ao tipo de nociceptor ativado para cada estímulo, ou seja, neste caso, os mecanonociceptores (sensíveis a estímulos mecânicos) não foram influenciados com a inibição da SR.

O excesso de BH4 em camundongos é produzido por neurônios sensoriais lesionados e por infiltrados de macrófagos no nervo danificado e no tecido inflamado. Essa superprodução de BH4 nos neurônios do gânglio da raiz dorsal promove um aumento na sensibilidade a dor, enquanto que uma redução desse cofator, reduz a hipersensibilidade dolorosa (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). Nossos achados reforçam os resultados da literatura onde os macrófagos mostram estar envolvidos nos mecanismos de dor e na produção de BH4 (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015).

A administração de SPRI3 em camundongos que sofreram lesão do nervo ciático, além de causar analgesia, também causou um aumento na concentração de sepiapterina no plasma e em homogenato de

gânglios da raiz dorsal e de nervo ciático (LATREMOLIERE, A. *et al.*, 2015). O aumento urinário na concentração de sepiapterina é consequência da inibição da enzima SR, e correlacionou com uma diminuição nas concentrações de BH4. Ainda, os resultados aqui apresentados indicam que a sepiapterina não se acumula, e que dessa forma, a sepiapterina urinária mostrou ser um bom biomarcador para monitorar de forma sensível a inibição na síntese de BH4. Em humanos, a sepiapterina detectada em urina mostrou ser um confiável biomarcador para diagnóstico de deficiência da enzima SR (CARDUCCI *et al.*, 2015).

Com base em nossos achados, buscamos consolidar uma efetiva contribuição para o melhor entendimento do envolvimento da BH4 e seu metabólito sepiapterina, na fisiopatologia da dor inflamatória. Assim, identificar compostos que minimizem os sintomas da dor, bem como, biomarcadores que permitem o seguimento de um determinado tratamento farmacológico, podem se tornar ferramentas poderosas na clínica para avaliar objetivamente a eficácia de um tratamento particular.

6.5 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que: (I) a superprodução de BH4 contribui para a hipersensibilidade a dor térmica em modelo de artrite reumatoide; (II) o inibidor SPRI3 é eficiente na redução das concentrações de BH4; e (III) a sepiapterina urinária é um bom biomarcador e uma apropriada via para analisar o metabolismo da BH4 em humanos.

7. CAPÍTULO III: EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO NA PRODUÇÃO DE NEOPTERINA EM UM ESTADO INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO

Neste capítulo, será apresentado o efeito da administração crônica de LPS sobre o metabolismo dopaminérgico, bem como, o efeito do exercício físico sobre a produção de neopterina em um estado inflamatório.

A administração sistêmica de LPS é um modelo comumente utilizado para induzir neuroinflamação (BERG *et al.*, 2004; HENRY *et al.*, 2009). O LPS é um dos principais componentes da membrana exterior da bactérias gram-negativas. Quando o LPS entra na corrente sanguínea, ele ativa o receptor do tipo *Toll* 4 (TLR4) ver Figura 25, que

está localizado na superfície de células do sistema imunológico, levando a liberação de citocinas pró-inflamatórias e a inflamação (HENRY *et al.*, 2008; SPULBER *et al.*, 2012).

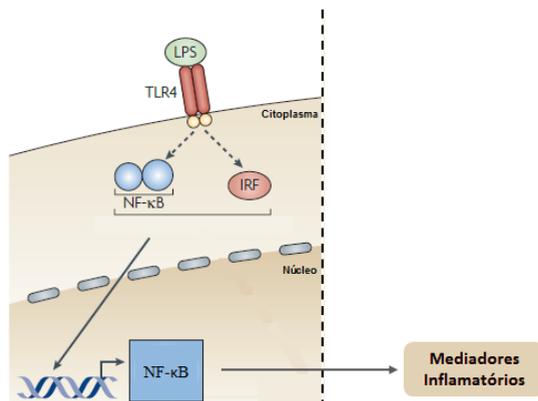


Figura 25: Representação esquemática da ativação do receptor do tipo Toll 4 pelo lipopolissacarídeo bacteriano. O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ativa o receptor do tipo Toll 4 (TLR4 – *toll like receptor*), que está localizado na superfície de células do sistema imunológico, levando a ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear-κB (NF-κB) e fator regulatório de interferon (IRF). Estes fatores de transcrição controlam a indução de mediadores inflamatórios, como as citocinas, IL-1, IL-6, TNF-α, TNF-β, INF-α, IFN-β. Modificado de MEDZHITOV e HORNG (2009).

7.1. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos adultos (20-25g) obtidos do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde permaneceram sob um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas, a uma temperatura ambiental de aproximadamente 22±1 °C, com acesso livre à água e ração para roedores (Nuvital, PR, Brasil). Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais (PP00760/CEUA) da UFSC.

7.1.2. Teste de carga incremental

O teste de carga incremental foi realizado conforme descrito no item 5.1.7.2 do Capítulo I. A velocidade final do teste determinou a

intensidade em que os animais realizaram o protocolo de exercício físico (BILLAT *et al.*, 2005; AGUIAR *et al.*, 2016).

7.1.3. Protocolo de exercício físico

O programa de treinamento físico progressivo consistiu de 5 sessões por semana em esteira ergométrica adaptada com intervalo de 24 horas a cada sessão, durante 3 semanas (AGUIAR *et al.*, 2016). Os treinamentos foram realizados a partir das 18h, período que corresponde ao ciclo claro dos animais. A velocidade do exercício foi definida em 16 m/min que representou 60% da velocidade final encontrada no teste de carga incremental, e com aumento progressivo do tempo de treino durante as semanas (30, 40 e 50 min/dia), sem inclinação (AGUIAR *et al.*, 2016). A intensidade de 60% foi escolhida por representar um exercício de intensidade moderada (SCHEFER e TALAN, 1996).

7.1.4. Neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo bacteriano

7.1.4.1 Infusão crônica de LPS

Camundongos C57BL/6 receberam o implante de minibombas osmóticas (Alzet® modelo 2002) para infusão contínua de LPS num fluxo de 0,5 μ L/h durante 2 semanas (NGUYEN *et al.*, 2014). As soluções de LPS 0,33 e 0,83 mg/kg foram diluídas em cloreto de sódio 0,9% (veículo). Os animais do grupo controle receberam o implante de minibombas preenchidas com veículo. Para implantação das minibombas osmóticas os animais foram anestesiados com solução de cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (20 mg/kg) e as minibombas osmóticas foram implantadas subcutaneamente e conectadas a um cateter intraperitoneal. As doses utilizadas de LPS foi de acordo com estudos prévios do nosso grupo de pesquisa e outros que mostraram a resposta pró-inflamatória em camundongos adultos (HENRY *et al.*, 2009; SPULBER *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2014; GHISONI *et al.*, 2016).

Vinte e quatro horas após o final da administração de LPS, o cérebro foi dissecado para a coleta do estriado e o músculo esquelético para a coleta do quadríceps. As amostras foram mantidas a -86°C até a análise de quantificação das aminas biogênicas no cérebro e atividade do complexo I no músculo.

7.1.4.2 Administração aguda de LPS

Camundongos C57BL/6 receberam uma única administração de LPS 0,33 mg/kg (i.p) com o intuito de avaliar o comprometimento sobre o desempenho físico em teste incremental de esforço (MARTIN *et al.*, 2013). A administração foi realizada 4h e 24h antes de iniciar o teste. A

solução de LPS foi diluída em cloreto de sódio 0,9% (veículo) e injetada em um volume de 0,1mL por cada 10g de massa corporal. Os animais do grupo controle receberam igual volume de cloreto de sódio 0,9% (veículo).

7.1.5. Procedimentos e análises

Tanto a experimentação quanto as análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, LABOX, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, UFSC.

Para as avaliações comportamentais referentes ao teste de esforço físico e protocolo de treinamento, utilizou-se o espaço físico do Laboratório de Doenças Neurodegenerativas, coordenado pelo Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger do Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFSC.

7.1.6. Coleta amostras de urina

As amostras de urina foram coletadas antes (amostra pré) e após 1, 3, 7, 10 e 14 dias da implantação da bomba osmótica contendo LPS ou veículo. O procedimento de coleta da urina foi realizado conforme descrito no item 6.1.7.1 do Capítulo II.

7.1.7. Mensurações bioquímicas

7.1.7.1 Quantificação de DA, DOPAC e 5-HT

As amins biogênicas DA, DOPAC e 5-HT foram quantificados em estriado por HPLC (Alliance e2695, detector Waters 2465, Waters, Milford, EUA), conforme descrito no item 5.1.8.1 do Capítulo I.

7.1.7.2 Quantificação de neopterina

As amostras de urina foram centrifugadas a $16.000 \times g$ durante 10min a 4°C e diluídas em fase móvel. As concentrações de neopterina presentes no sobrenadante foram determinados por HPLC, utilizando cromatógrafo Waters composto por módulo de separação Waters e2695 e detector fluorescente Multi λ Waters 2475 (Alliance e2695, Waters, Milford, EUA). Dez microlitros do sobrenadante foram injetados no sistema de HPLC. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa SUPELCOSIL™ LC-18T, com dimensões de 15 x 4,6 mm, 5 μ m, utilizando-se como fase móvel tampão fosfato de potássio, 15 mM, pH 6,4 com fluxo de 0,7 mL/min. O detector de fluorescência (Waters 2475) foi ajustado para uma excitação de 350nm e uma emissão

de 430nm (DE LUCAS *et al.*, 2014). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mol}$ creatinina.

7.1.7.3 Mensuração da atividade do complexo I

Para a mensuração da atividade do complexo I da cadeia respiratória, o músculo esquelético quadríceps foi homogeneizado em dez volumes de tampão fosfato de potássio 5mM, pH 7,4, contendo sacarose 300mM, MOPS 5mM, EGTA 1mM e albumina sérica bovina 0,1%. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado a $3.000 \times g$ durante 10min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso no mesmo tampão utilizado no processo de homogeneização, constituindo uma suspensão rica em mitocôndrias (LATINI *et al.*, 2005).

A atividade do complexo I foi mensurada através da redução do ferricianeto dependente de NADH em um comprimento de onda de 420 nm, como previamente descrito por CASSINA e RADI (1996) e aperfeiçoado por LATINI *et al.* (2005). A atividade do complexo da cadeia respiratória foi mensurada utilizando-se o espectrofotômetro com temperatura controlada (Infinite® 200 PRO TECAN, Männedorf, Suíça). Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína.

7.1.7.4 Dosagem de proteína

O conteúdo proteico das amostras foi mensurado empregando o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

7.2. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram expressos em média \pm EPM. A análise inferencial da estatística foi realizada na maioria dos desenhos experimentais, através de análise de variância ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Turkey, quando os valores de F foram significativos. Para comparações entre dois grupos de amostras pareadas ou independentes utilizou-se o teste t de Student. Para observar diferenças entre grupos no teste ergométrico utilizou-se o teste de Log-rank (Mantel-Cox).

As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$ (IC=95%). As análises estatísticas e gráficos foram realizados através do programa GraphPad Prisma 6®.

7.3. RESULTADOS

7.3.1. Avaliação da produção de neopterin urinária em camundongos C57BL/6 adultos submetidos a um estado inflamatório crônico induzido por LPS

A Figura 26A ilustra a administração de LPS 0,33 mg/kg liberada de forma contínua durante duas semanas por meio de uma bomba osmótica conectada a um cateter intraperitoneal.

A Figura 26B mostra que a administração de LPS reduziu significativamente o peso corporal dois dias após o início do protocolo ($P < 0,05$). Ainda, a Figura 26C mostra um aumento nas concentrações de neopterin detectada em urina um e três dias após o início da administração, sendo que no sétimo dia as concentrações recuperaram os valores basais ($P < 0,05$).

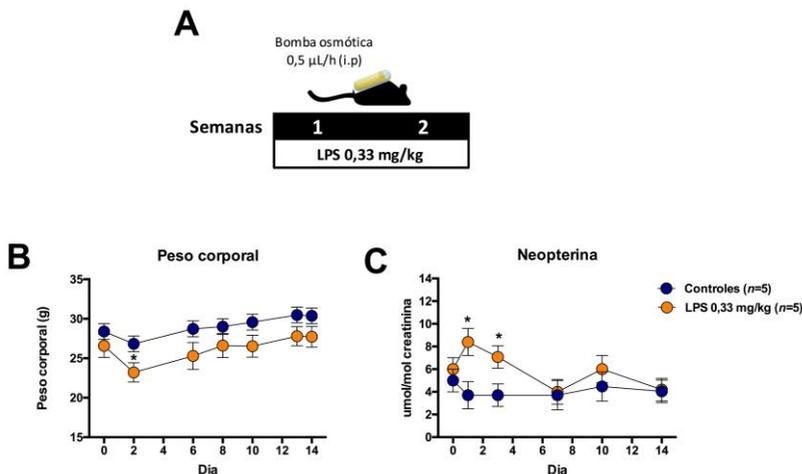


Figura 26: Produção de neopterin urinária em camundongos C57BL/6 adultos submetidos a inflamação induzida por LPS. Administração de LPS 0,33 mg/kg liberada de forma contínua durante duas semanas por meio de uma bomba osmótica conectada a um cateter intraperitoneal (A), peso corporal (B) e produção de neopterin urinária (C). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. grupo controle (teste *t* de Student).

7.3.2. Avaliação da concentração de aminas biogênicas em um estado inflamatório crônico induzido por LPS

As Figuras 27A e 27B mostram uma diminuição nas concentrações de DA ($P < 0,05$) e seu metabólico DOPAC ($P < 0,05$), respectivamente, após duas semanas de administração com LPS 0,33 mg/kg. Não foi observado diferenças significativas na concentração de 5-HT como mostra a Figura 27C.

Ainda, a Figura 27D mostra um aumento na relação entre 5-HT e DA ($P < 0,05$) provocado pela administração contínua de LPS.

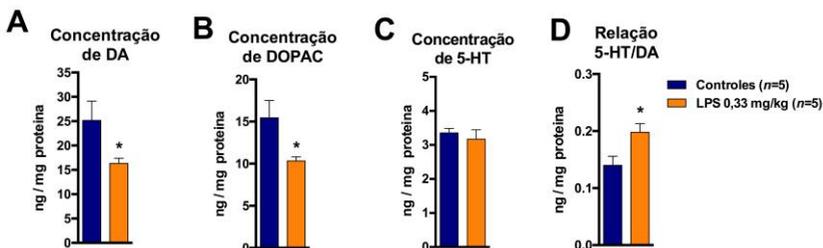


Figura 27: Concentração de aminas biogênicas em um estado inflamatório crônico induzido por LPS. Administração de LPS 0,33 mg/kg liberada de forma contínua durante duas semanas por meio de uma bomba osmótica conectada a um cateter intraperitoneal. Concentração das aminas biogênicas dopamina (DA; A), ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC; B), serotonina (5-HT; C) e a relação 5-HT e DA (D). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ vs. grupo controle (teste t de Student).

7.3.3. Avaliação do efeito da administração aguda de LPS sobre o desempenho físico

A Figura 28A ilustra o teste incremental que avaliou a capacidade máxima de esforço de camundongos C57BL/6 adultos. Os animais foram inicialmente adaptados à esteira durante quatro dias, numa velocidade de 10 m/min, por 10min. O teste de esforço iniciou 4h ou 24h após uma única administração de LPS 0,33 mg/kg.

Podemos observar na Figura 28B uma diminuição no desempenho dos animais que receberam LPS em ambos os tempos ($P < 0,001$). No entanto, o grupo que recebeu LPS 24h antes de iniciar o teste mostrou uma melhora nos primeiros estágios do teste, quando comparado ao grupo que recebeu a administração 4h antes ($P < 0,001$).

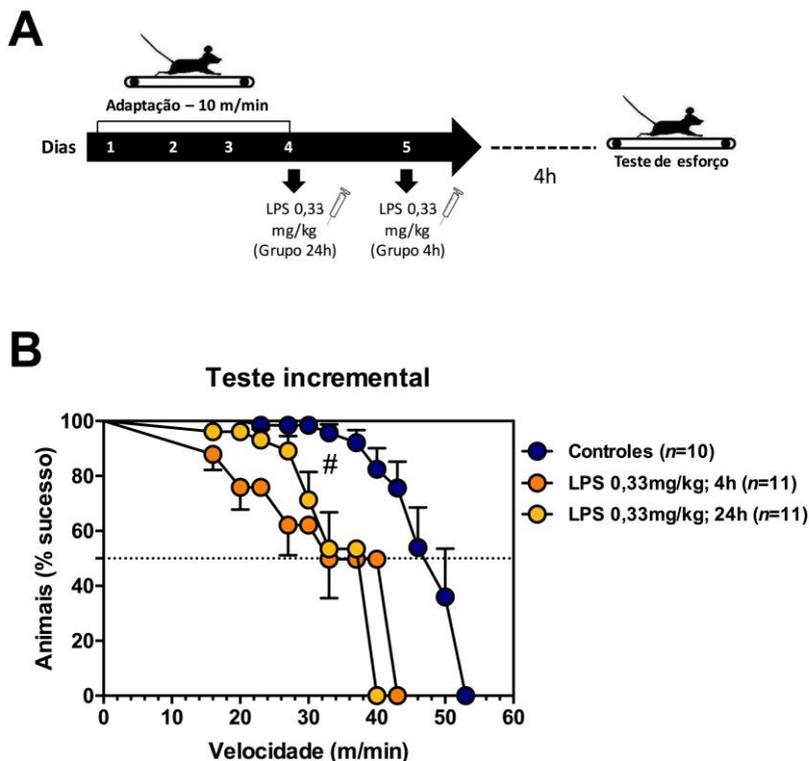


Figura 28: Efeito da administração aguda de LPS sobre o desempenho físico. Desempenho de camundongos C57BL/6 adultos em um teste incremental de esforço avaliado 4h e 24h após uma única administração de LPS 0,33 mg/kg. Os dados representam média \pm erro padrão da média. $^{\#}P < 0,001$ vs. grupo LPS 4h. (Log-rank; Mantel-Cox).

7.3.4. Avaliação do efeito do exercício físico sobre a produção de neopterin em camundongos C57BL/6 adultos submetidos a um estado inflamatório crônico induzida por LPS

A Figura 29A ilustra a realização de três semanas de exercício em esteira seguido da administração de LPS 0,83 mg/kg liberada de forma contínua durante duas semanas por meio de uma bomba osmótica conectada a um cateter intraperitoneal.

A Figura 29B mostra que a administração de LPS diminuiu significativamente a atividade do complexo I no músculo esquelético [$F_{(3,9)}=4,98$; $P < 0,05$], e que o exercício físico preveniu esta redução.

A Figura 29C mostra um aumento na produção de neopterina no grupo sedentário que recebeu LPS [$F_{(23,4)}=5,25$; $P < 0,0001$], que foi prevenido pelo exercício físico [$F_{(23,4)}=5,25$; $P < 0,0001$]. Ainda, como esperado, o exercício *per se* provocou um leve aumento na produção de neopterina [$F_{(23,4)}=5,25$; $P < 0,0001$].

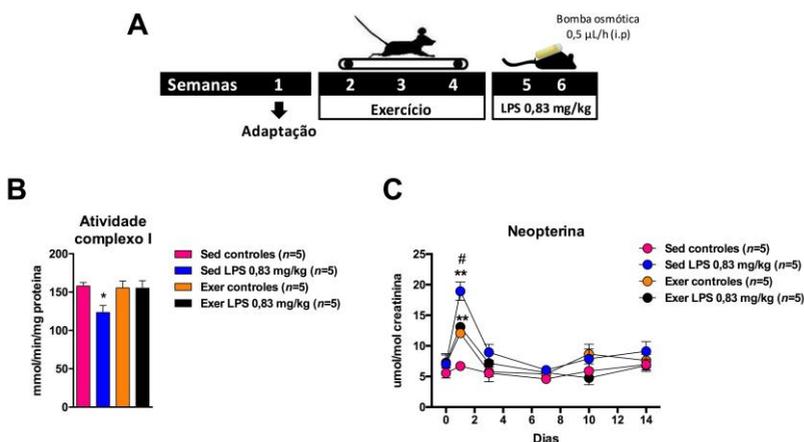


Figura 29: Efeito do exercício físico sobre a produção de neopterina em camundongos C57BL/6 adultos submetidos a um estado inflamatório crônico induzido por LPS. Realização de três semanas de exercício em esteira seguido da administração de LPS 0,83 mg/kg liberada de forma contínua durante duas semanas por meio de uma bomba osmótica conectada a um cateter intraperitoneal (A), atividade do complexo I da cadeia respiratória em músculo esquelético (B) e produção de neopterina urinária (C). Os dados representam média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,0001$ vs. Sed controles; # $P < 0,0001$ vs. Exer LPS (ANOVA de duas vias seguida de teste *post-hoc* de Turkey).

7.4. DISCUSSÃO

Os achados aqui apresentados mostram que o sistema dopaminérgico foi comprometido por um estado inflamatório crônico e que o exercício físico preveniu o aumento na produção de neopterina induzido pela administração contínua de LPS.

Os processos inflamatórios são caracterizados pelo aumento no número de células imunes ativadas, além da concentração de citocinas e

quimiocinas (HENRY *et al.*, 2009; SUH *et al.*, 2014). Algumas moléculas sintetizadas durante a inflamação, como a neopterina, podem ser mensuradas e utilizadas como biomarcadores periféricos, a fim de caracterizar precocemente, avaliar a progressão, ou bem monitorar o tratamento paliativo em processos sistêmicos e/ou neurológicos com base inflamatória (BRODACKI *et al.*, 2008; MOLERO-LUIS *et al.*, 2013a; SUH *et al.*, 2014). A neopterina é um subproduto da via de síntese *de novo* da BH4, no entanto, sua produção é aumentada sob condições de estresse celular induzido por estímulos inflamatórios, incluindo IFN- γ , LPS, H₂O₂, entre outros (para revisão ver GHISONI *et al.* (2015). Dados da literatura sugerem que macrófagos e monócitos seriam os principais produtores periféricos de neopterina em humanos (WERNER *et al.*, 1990). Desta forma, um aumento nas concentrações de neopterina em fluidos biológicos tem sido considerado um marcador sensível de ativação do sistema imune. Nesse sentido, a mensuração de elevadas concentrações de neopterina tem sido um biomarcador para ao desenvolvimento e progressão de doenças com comprometimento neurológico, como as doenças de Alzheimer e Parkinson (HULL, PASINETTI e AISEN, 2000; WIDNER, LEBLHUBER e FUCHS, 2002a; WISSMANN *et al.*, 2013).

A origem de neopterina no SNC ainda não está bem esclarecida. Contudo, a literatura tem apontado que a neopterina poderia atravessar a BHE e sua concentração no líquido refletiria as concentrações séricas ou plasmáticas (FUCHS *et al.*, 1989a). Entretanto, além desse processo ocorrer em um quociente muito baixo (1:40) (HAGBERG *et al.*, 1993), as concentrações de neopterina são maiores no líquido do que no plasma ou soro, por exemplo, em pacientes com doenças neurológicas com a BHE intacta (KUEHNE *et al.*, 2013). De acordo com esta proposta de origem central da neopterina, nosso grupo de pesquisa demonstrou pela primeira vez que tecido cerebral (fatias de hipocampo) e astrócitos estriatais em condições de toxicidade mitocondrial produzem e secretam neopterina (GHISONI e LATINI, 2015; GHISONI *et al.*, 2016). Aqui, os resultados mostraram uma associação entre um comprometimento do sistema dopaminérgico e um aumento nas concentrações de neopterina detectada em urina. Isto reforçaria à neopterina como um biomarcador sensível capaz de refletir um prejuízo no SNC.

No entanto, o aumento da neopterina ocorreu apenas nos primeiros dias após o estímulo com LPS. Este é um fenômeno esperado, uma vez que a inflamação apenas torna-se crônica se o processo de resolução falhar (SERHAN, 2014). Em condições agudas, o estímulo é detectado por receptores específicos, levando a cascatas de sinalização

que induzem a liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas (SERHAN, 2014; PERUCCI *et al.*, 2017). Estes mediadores recrutam neutrófilos, monócitos e macrófagos para o local da inflamação para eliminar o estímulo. A remoção de neutrófilos disfuncionais fornece um sinal importante para transformar macrófagos inflamatórios em macrófagos pró-resolução (SOEHNLEIN *et al.*, 2017). Os mediadores produzidos por macrófagos pró-resolução neutralizam os sinais inflamatórios e promovem o reparo tecidual. A inflamação crônica ocorre por duas razões: (i) se o hospedeiro é incapaz de remover o estímulo iniciador; (ii) se o hospedeiro não conseguir gerar uma resposta de resolução, a qual é necessária para substituir o programa de inflamação auto-sustentável (MEDZHITOV e HORNG, 2009; SOEHNLEIN *et al.*, 2017). Nós verificamos que ambas as doses utilizadas de LPS (0,33 e 0,83 mg/kg) não geraram uma condição de inflamação crônica, confirmada pelos valores basais de neopterin após o terceiro dia.

O número de investigações relativas ao aumento das concentrações plasmáticas e urinárias de neopterin em atletas e animais após exercício de alta-intensidade tem aumentado exponencialmente (SPRENGER *et al.*, 1992; TILZ *et al.*, 1993; DE LUCAS *et al.*, 2014; LINDSAY *et al.*, 2015). Concentrações elevadas de neopterin foram encontradas na urina de jogadores de rugby logo após o jogo e correlacionadas com aumento de estresse oxidativo e de um estado inflamatório, o que contribuiu para o dano muscular (LINDSAY *et al.*, 2016). Em trabalho do nosso grupo, também foi encontrado um aumento nas concentrações de neopterin, bem como, marcadores de dano muscular e metabolismo oxidativo em soro de atletas após uma prova de multiesportes e ultra resistência (28,5 km de corrida, 42,5 km de *mountain biking* e 17,5 km de caiaque). Nesse trabalho foi sugerido que o aumento nas concentrações de neopterin indicaria a ativação do sistema imunológico e que poderia servir como um biomarcador de atividade física extrema ou *overtraining* (DE LUCAS *et al.*, 2014). Ainda, um aumento significativo nas concentrações de neopterin urinária também foi encontrado em corredores de ultramaratona, e foi associado com aumento do estresse oxidativo, resposta inflamatória, comprometimento temporário da função renal e redução de desempenho físico (MRAKIC-SPOSTA *et al.*, 2015). Nossos resultados também mostraram uma diminuição no desempenho físico de animais em um estado inflamatório induzido pela administração aguda de LPS 0,33 mg/kg. A dose utilizada já é conhecida por aumentar as concentrações de citocinas, como TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6, em tecido cerebral de

animais no tempo de 4h (MARTIN *et al.*, 2013; GHISONI *et al.*, 2016). Este achado contribui para a associação entre inflamação e prejuízo locomotor (SPULBER *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2014).

Embora existam inúmeras publicações na literatura descrevendo o aumento de neopterina em fluidos biológicos em diferentes condições humanas, incluindo o exercício físico, pouco se sabe sobre as funções desta pteridina no organismo. Alguns autores relatam a neopterina como um produto exclusivo de excreção, enquanto outros associaram altas concentrações de neopterina com estresse oxidativo, inflamação e apoptose (WEISS *et al.*, 1993; HOFFMANN *et al.*, 1996; SCHOBERSBERGER *et al.*, 1996; CIRILLO *et al.*, 2006), como observado em exercício físico de alta intensidade quando o sistema imune é ativado. No entanto, nosso grupo demonstrou recentemente que a neopterina possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias mediada por mecanismos intracelulares (GHISONI e LATINI, 2015; GHISONI *et al.*, 2015). A administração intracerebroventricular (i.c.v) de neopterina melhorou a resistência ao estresse oxidativo em córtex cerebral de ratos suíços adultos saudáveis, aumentando o conteúdo de glutatona e a atividade das enzimas antioxidantes metabolizadoras de glutatona, como a glutatona peroxidase e glutatona redutase (GHISONI e LATINI, 2015). Ainda, injeções i.c.v de neopterina reduziu as concentrações de IL-6 no cérebro de camundongos idosos *knockout* para IL-10 tratados com LPS (GHISONI *et al.*, 2016). Por outro lado, o nosso grupo de pesquisa também demonstrou que a neopterina é um potenciador cognitivo endógeno, facilitando a aquisição de memória aversiva e reduzindo o limiar para gerar a potencialização hipocampal a longo prazo (GHISONI *et al.*, 2016), um mecanismo essencial para a formação da memória (ABRAHAM *et al.*, 2002). Nesse sentido, de acordo com nossos resultados e com base na literatura, nós sugerimos que o exercício físico: (i) previne um aumento exacerbado de neopterina em um estado inflamatório e (ii) o exercício físico *per se* aumenta a concentração de neopterina como um mecanismo para prevenir contra estresse oxidativo e inflamação. Os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios do exercício já têm sido descritos por inúmeros pesquisadores (COELHO *et al.*, 2010; GLEESON *et al.*, 2011; SPECK *et al.*, 2014; TUON *et al.*, 2015; DALLAGNOL *et al.*, 2017).

Ainda, muitos trabalhos têm demonstrado o efeito do exercício físico sobre o metabolismo energético muscular (PINHO *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2009; AGUIAR *et al.*, 2016). Aguiar e colaboradores, observaram um aumento na atividade do complexo I da cadeia respiratória em camundongos C57BL/6 que realizaram exercício físico

em esteira por seis semanas (AGUIAR *et al.*, 2016). No entanto, nosso resultado demonstra que o efeito adaptativo do exercício sobre o metabolismo mitocondrial não perdura após duas semanas de recuperação, período em que nossa análise foi realizada. Entretanto, o exercício físico preveniu a redução na atividade do complexo I induzido por LPS, estando de acordo com outros trabalhos que também demonstraram um efeito preventivo do exercício sobre o metabolismo oxidativo (AGUIAR *et al.*, 2014; NESI *et al.*, 2016).

7.5 CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos resultados sugerem que: (i) a neopterinina urinária é um marcador sensível de ativação do sistema imune; e (ii) o exercício físico de intensidade moderada, pode ser uma importante ferramenta para prevenir contra os efeitos centrais e periféricos causados por um estado inflamatório persistente.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, W. C. *et al.* . Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. **J Neurosci**, v. 22, n. 21, p. 9626-34, 2002.
- ADELL, A.; ARTIGAS, F. The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 28, n. 4, p. 415-31, 2004.
- AGUIAR, A. S., JR. *et al.* . Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Res Bull**, v. 79, n. 6, p. 452-7, 2009.
- AGUIAR, A. S., JR. *et al.* . Moderate-Intensity Physical Exercise Protects Against Experimental 6-Hydroxydopamine-Induced Hemiparkinsonism Through Nrf2-Antioxidant Response Element Pathway. **Neurochem Res**, v. 41, n. 1-2, p. 64-72, 2016.
- AGUIAR, A. S., JR. *et al.* . Effects of exercise on mitochondrial function, neuroplasticity and anxio-depressive behavior of mice. **Neuroscience**, v. 271, p. 56-63, 2014.
- ALVES, G. *et al.* . Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 255 Suppl 5, p. 18-32, 2008.
- ANTONINI, A. *et al.* . The metabolic anatomy of tremor in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 51, n. 3, p. 803-10, 1998.
- ARCHER, T.; FREDRIKSSON, A.; JOHANSSON, B. Exercise alleviates Parkinsonism: clinical and laboratory evidence. **Acta Neurol Scand**, v. 123, n. 2, p. 73-84, 2011.
- AVENDANO, M. S. *et al.* . Increased nitric oxide bioavailability in adult GRK2 hemizygous mice protects against angiotensin II-induced hypertension. **Hypertension**, v. 63, n. 2, p. 369-75, 2014.
- BAS, D. B. *et al.* . Collagen antibody-induced arthritis evokes persistent pain with spinal glial involvement and transient prostaglandin dependency. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 12, p. 3886-96, 2012.

BAUER, M. *et al.* . Glial cell line-derived neurotrophic factor up-regulates GTP-cyclohydrolase I activity and tetrahydrobiopterin levels in primary dopaminergic neurones. **J Neurochem**, v. 82, n. 5, p. 1300-10, 2002.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 1, p. 182-217, 2011.

BECHMANN, I.; NITSCH, R. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. **Glia**, v. 20, n. 2, p. 145-54, 1997.

BEHAN, W. M. *et al.* . Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. **Br J Pharmacol**, v. 128, n. 8, p. 1754-60, 1999.

BENARROCH, E. E. Descending monoaminergic pain modulation: bidirectional control and clinical relevance. **Neurology**, v. 71, n. 3, p. 217-21, 2008.

BENDER, D. A. Biochemistry of tryptophan in health and disease. **Mol Aspects Med**, v. 6, n. 2, p. 101-97, 1983.

BERARDELLI, A. *et al.* . Pathophysiology of bradykinesia in Parkinson's disease. **Brain**, v. 124, n. Pt 11, p. 2131-46, 2001.

BERG, B. M. *et al.* . Alpha-tocopherol attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behavior in mice. **Brain Behav Immun**, v. 18, n. 2, p. 149-57, 2004.

BERNHEIMER, H. *et al.* . Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. **J Neurol Sci**, v. 20, n. 4, p. 415-55, 1973.

BIBEAU, W. S. *et al.* . Effects of acute resistance training of different intensities and rest periods on anxiety and affect. **J Strength Cond Res**, v. 24, n. 8, p. 2184-91, 2010.

BILLAT, V. L. *et al.* . Inter- and intrastain variation in mouse critical running speed. **J Appl Physiol** (1985), v. 98, n. 4, p. 1258-63, 2005.

BLAU, N.; BONAFE, L.; THONY, B. Tetrahydrobiopterin deficiencies without hyperphenylalaninemia: diagnosis and genetics of dopa-responsive dystonia and sepiapterin reductase deficiency. **Mol Genet Metab**, v. 74, n. 1-2, p. 172-85, 2001.

BLISS, E. L.; AILION, J. Relationship of stress and activity to brain dopamine and homovanillic acid. **Life Sci I**, v. 10, n. 20, p. 1161-9, 1971.

BOLANDGHAMAT, S.; MOGHIMI, A.; IRANSHAHI, M. Effects of ethanolic extract of pine needles (*Pinus eldarica* Medw.) on reserpine-induced depression-like behavior in male Wistar rats. **Pharmacogn Mag**, v. 7, n. 27, p. 248-53, 2011.

BONAFE, L. *et al.* . Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia. **Am J Hum Genet**, v. 69, n. 2, p. 269-77, 2001.

BOREK, L. L.; AMICK, M. M.; FRIEDMAN, J. H. Non-motor aspects of Parkinson's disease. **CNS Spectr**, v. 11, n. 7, p. 541-54, 2006.

BOWMAN, C. C. *et al.* . Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. **Glia**, v. 43, n. 3, p. 281-91, 2003.

BRACHER, A. *et al.* . Biosynthesis of pteridines. NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 43, p. 28132-41, 1998.

BRICHTA, L.; GREENGARD, P.; FLAJOLET, M. Advances in the pharmacological treatment of Parkinson's disease: targeting neurotransmitter systems. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 9, p. 543-54, 2013.

BROCHARD, V. *et al.* . Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. **J Clin Invest**, v. 119, n. 1, p. 182-92, 2009.

BRODACKI, B. *et al.* . Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. **Neurosci Lett**, v. 441, n. 2, p. 158-62, 2008.

BRUUNSGAARD, H. *et al.* . Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. **Clin Exp Immunol**, v. 121, n. 2, p. 255-60, 2000.

BURCH, D.; SHEERIN, F. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 365, n. 9459, p. 622-7, 2005.

BUTOVSKY, O. *et al.* . Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. **Mol Cell Neurosci**, v. 31, n. 1, p. 149-60, 2006.

CADET, J. L.; BRANNOCK, C. Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. **Neurochem Int**, v. 32, n. 2, p. 117-31, 1998.

CAPRILLI, R. *et al.* . The long journey of salicylates in ulcerative colitis: The past and the future. **J Crohns Colitis**, v. 3, n. 3, p. 149-56, 2009.

CAPUTO, F. *et al.* . Exercício aeróbio: Aspectos bioenergéticos, ajustes fisiológicos, fadiga e índices de desempenho. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 11, n. 1, p. 94-102, 2009.

CARDUCCI, C. *et al.* . Urine sepiapterin excretion as a new diagnostic marker for sepiapterin reductase deficiency. **Mol Genet Metab**, v. 115, n. 4, p. 157-60, 2015.

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

CARSON, M. J. *et al.* . CNS immune privilege: hiding in plain sight. **Immunol Rev**, v. 213, p. 48-65, 2006.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for

health-related research. **Public Health Rep**, v. 100, n. 2, p. 126-31, 1985.

CASSINA, A.; RADI, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch Biochem Biophys**, v. 328, n. 2, p. 309-16, 1996.

CASTRO, A. A. *et al.* . Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res**, v. 229, n. 1, p. 208-15, 2012.

CASTRO, J. P. *et al.* . Effects of baclofen on reserpine-induced vacuous chewing movements in mice. **Brain Res Bull**, v. 68, n. 6, p. 436-41, 2006.

CHAUDHRY, F. A.; EDWARDS, R. H.; FONNUM, F. Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 48, p. 277-301, 2008.

CHAUDHURI, A.; BEHAN, P. O. Fatigue in neurological disorders. **Lancet**, v. 363, n. 9413, p. 978-88, 2004.

CHAUDHURI, K. R.; HEALY, D. G.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 3, p. 235-45, 2006.

CHAUDHURI, K. R.; NAIDU, Y. Early Parkinson's disease and non-motor issues. **J Neurol**, v. 255 Suppl 5, p. 33-8, 2008.

CHAUDHURI, K. R. *et al.* . Parkinson's disease: the non-motor issues. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 17, n. 10, p. 717-23, 2011.

CHEN, R.; FURMAN, C. A.; GNEGY, M. E. Dopamine transporter trafficking: rapid response on demand. **Future Neurol**, v. 5, n. 1, p. 123, 2010.

CHIDLEY, C. *et al.* . A yeast-based screen reveals that sulfasalazine inhibits tetrahydrobiopterin biosynthesis. **Nat Chem Biol**, v. 7, n. 6, p. 375-83, 2011.

CHITTIPROL, S. *et al.* . Oxidative stress and neopterin abnormalities in schizophrenia: a longitudinal study. **J Psychiatr Res**, v. 44, n. 5, p. 310-3, 2010.

CHOI, S. S. *et al.* . Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e92325, 2014.

CHU, V. *et al.* . Method for non-invasively recording electrocardiograms in conscious mice. **BMC Physiol**, v. 1, p. 6, 2001.

CIRILLO, P. *et al.* . Neopterin induces pro-atherothrombotic phenotype in human coronary endothelial cells. **J Thromb Haemost**, v. 4, n. 10, p. 2248-55, 2006.

CODOLO, G. *et al.* . Triggering of inflammasome by aggregated alpha-synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55375, 2013.

COELHO, B. L. *et al.* . Physical exercise prevents the exacerbation of oxidative stress parameters in chronic kidney disease. **J Ren Nutr**, v. 20, n. 3, p. 169-75, 2010.

COLLOCA, L. *et al.* . Neuropathic pain. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17002, 2017.

COSENTINO, F. *et al.* . Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. **J Clin Invest**, v. 101, n. 7, p. 1530-7, 1998.

COSTIGAN, M.; LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Analgesia by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis. **Curr Opin Pharmacol**, v. 12, n. 1, p. 92-9, 2012.

CUNNINGTON, C.; CHANNON, K. M. Tetrahydrobiopterin: pleiotropic roles in cardiovascular pathophysiology. **Heart**, v. 96, n. 23, p. 1872-7, 2010.

D'SA, C. *et al.* . Tetrahydrobiopterin biosynthesis in C6 glioma cells: induction of GTP cyclohydrolase I gene expression by

lipopolysaccharide and cytokine treatment. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 41, n. 1-2, p. 105-10, 1996.

DAI, W.; GUPTA, S. L. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha. **J Biol Chem**, v. 265, n. 32, p. 19871-7, 1990.

DALLAGNOL, K. M. *et al.* . Running for REST: Physical activity attenuates neuroinflammation in the hippocampus of aged mice. **Brain Behav Immun**, v. 61, p. 31-35, 2017.

DANTZER, R. *et al.* . Cytokines and sickness behavior. **Ann N Y Acad Sci**, v. 840, p. 586-90, 1998.

DAS, T. *et al.* . Multifaceted innate immune responses engaged by astrocytes, microglia and resident dendritic cells against Chikungunya neuroinfection. **J Gen Virol**, v. 96, n. Pt 2, p. 294-310, 2015.

DAVIS, J. M.; BAILEY, S. P. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 29, n. 1, p. 45-57, 1997.

DAVIS, J. M. *et al.* . Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, n. 4, p. R1071-7, 2009.

DAVIS, J. M. *et al.* . Immune system activation and fatigue during treadmill running: role of interferon. **Med Sci Sports Exerc**, v. 30, n. 6, p. 863-8, 1998.

DE LUCAS, R. D. *et al.* . Increased platelet oxidative metabolism, blood oxidative stress and neopterin levels after ultra-endurance exercise. **J Sports Sci**, v. 32, n. 1, p. 22-30, 2014.

DELEURAN, B. W. *et al.* . Localization of interleukin-1 alpha, type 1 interleukin-1 receptor and interleukin-1 receptor antagonist in the synovial membrane and cartilage/pannus junction in rheumatoid arthritis. **Br J Rheumatol**, v. 31, n. 12, p. 801-9, 1992.

DIXON, W. J. Efficient analysis of experimental observations. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 20, p. 441-62, 1980.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3760-72, 2010.

DUNSTAN, D. W. *et al.* . Television viewing time and mortality: the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study (AusDiab). **Circulation**, v. 121, n. 3, p. 384-91, 2010.

DUTRA, R. C. *et al.* . Behavioral effects of MK-801 on reserpine-treated mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 26, n. 3, p. 487-95, 2002.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 4, p. 1357-91, 2011.

EASTGATE, J. A. *et al.* . Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 2, n. 8613, p. 706-9, 1988.

ELBERS, R. *et al.* . Is impact of fatigue an independent factor associated with physical activity in patients with idiopathic Parkinson's disease? **Mov Disord**, v. 24, n. 10, p. 1512-8, 2009.

ENGELHARDT, B.; VAJKOCZY, P.; WELLER, R. O. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. **Nat Immunol**, v. 18, n. 2, p. 123-131, 2017.

ERSHLER, W. B.; KELLER, E. T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. **Annu Rev Med**, v. 51, p. 245-70, 2000.

FABBRINI, G. *et al.* . Fatigue in Parkinson's disease: Motor or non-motor symptom? **Parkinsonism Relat Disord**, 2012.

FATTAHIAN, E. *et al.* . Anti-inflammatory Effect of Amitriptyline on Ulcerative Colitis in Normal and Reserpine-Induced Depressed Rats. **Iran J Pharm Res**, v. 15, n. Suppl, p. 125-137, 2016.

FELGER, J. C.; MILLER, A. H. Cytokine effects on the basal ganglia and dopamine function: the subcortical source of inflammatory malaise. **Front Neuroendocrinol**, v. 33, n. 3, p. 315-27, 2012.

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

FRANSCINI, N. *et al.* . Critical role of interleukin-1beta for transcriptional regulation of endothelial 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 23, n. 11, p. e50-3, 2003.

FRIEDMAN, J. H. Fatigue in Parkinson's disease patients. **Curr Treat Options Neurol**, v. 11, n. 3, p. 186-90, 2009.

FRIEDMAN, J. H. *et al.* . Fatigue in Parkinson's disease: a review. **Mov Disord**, v. 22, n. 3, p. 297-308, 2007.

FRIEND, D. M. *et al.* . Basal Ganglia Dysfunction Contributes to Physical Inactivity in Obesity. **Cell Metab**, v. 25, n. 2, p. 312-321, 2017.

FU, H. Q. *et al.* . Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e106331, 2014.

FUCHS, D. *et al.* . Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum of individuals infected with HIV-1. **AIDS**, v. 3, n. 5, p. 285-8, 1989a.

FUCHS, D. *et al.* . Neopterin as a predictive marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clin Chem**, v. 35, n. 8, p. 1746-9, 1989b.

FURUKAWA, Y. *et al.* . Dystonia with motor delay in compound heterozygotes for GTP-cyclohydrolase I gene mutations. **Ann Neurol**, v. 44, n. 1, p. 10-6, 1998.

GAINES, K. D.; HINSON, V. K. Adjunctive therapy in Parkinson's disease: the role of rasagiline. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 8, p. 285-94, 2012.

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

GARBER, C. E.; FRIEDMAN, J. H. Effects of fatigue on physical activity and function in patients with Parkinson's disease. **Neurology**, v. 60, n. 7, p. 1119-24, 2003.

GHISONI, K. *et al.* . Neopterin acts as an endogenous cognitive enhancer. **Brain Behav Immun**, v. 56, p. 156-64, 2016.

GHISONI, K.; LATINI, A. Kuehne LK, Reiber H, Bechter K, Hagberg L, Fuchs D., Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. *Journal of Psychiatric Research*, Volume 47, Issue 10, October 2013, pages 1417-1422. **J Psychiatr Res**, v. 63, p. 141-2, 2015.

GHISONI, K. *et al.* . Neopterin as a potential cytoprotective brain molecule. **J Psychiatr Res**, v. 71, p. 134-9, 2015.

GLEESON, M. *et al.* . The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 9, p. 607-15, 2011.

GODBOUT, J. P. *et al.* . Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system. **FASEB J**, v. 19, n. 10, p. 1329-31, 2005.

GOETZ, C. G. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, p. a008862, 2011.

GREEN, S. Measurement of anaerobic work capacities in humans. **Sports Med**, v. 19, n. 1, p. 32-42, 1995.

GRONTVED, A.; HU, F. B. Television viewing and risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and all-cause mortality: a meta-analysis. **JAMA**, v. 305, n. 23, p. 2448-55, 2011.

HAGBERG, L. *et al.* . Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. **AIDS Res Ther**, v. 7, p. 15, 2010.

HAGBERG, L. *et al.* . Cerebrospinal fluid neopterin concentrations in central nervous system infection. **J Infect Dis**, v. 168, n. 5, p. 1285-8, 1993.

HALEY, D. F. *et al.* . Retention strategies and factors associated with missed visits among low income women at increased risk of HIV acquisition in the US (HPTN 064). **AIDS Patient Care STDS**, v. 28, n. 4, p. 206-17, 2014.

HAMILTON, M. T.; HAMILTON, D. G.; ZDERIC, T. W. Role of low energy expenditure and sitting in obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. **Diabetes**, v. 56, n. 11, p. 2655-67, 2007.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 463-9, 2008.

HARUKI, H. *et al.* . Tetrahydrobiopterin biosynthesis as an off-target of sulfa drugs. **Science**, v. 340, n. 6135, p. 987-91, 2013.

HEIBERG, T.; KVIEN, T. K. Preferences for improved health examined in 1,024 patients with rheumatoid arthritis: pain has highest priority. **Arthritis Rheum**, v. 47, n. 4, p. 391-7, 2002.

HENEKA, M. T.; KUMMER, M. P.; LATZ, E. Innate immune activation in neurodegenerative disease. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 7, p. 463-77, 2014.

HENEKA, M. T. *et al.* . NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. **Nature**, v. 493, n. 7434, p. 674-8, 2013.

HENRY, C. J. *et al.* . Minocycline attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation, sickness behavior, and anhedonia. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 15, 2008.

HENRY, C. J. *et al.* . Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 3, p. 309-17, 2009.

HERNANDEZ-FONSECA, J. P. *et al.* . Structural and ultrastructural analysis of cerebral cortex, cerebellum, and hypothalamus from diabetic rats. **Exp Diabetes Res**, v. 2009, p. 329632, 2009.

HIRAKAWA, H. *et al.* . Expression analysis of the aldo-keto reductases involved in the novel biosynthetic pathway of tetrahydrobiopterin in human and mouse tissues. **J Biochem**, v. 146, n. 1, p. 51-60, 2009.

HIRSCH, E. C. *et al.* . The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 991, p. 214-28, 2003.

HOFF, J. I. *et al.* . Fatigue in Parkinson's disease is not associated with reduced physical activity. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 3, n. 1, p. 51-4, 1997.

HOFFMANN, G. *et al.* . Neopterin activates transcription factor nuclear factor-kappa B in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett**, v. 391, n. 1-2, p. 181-4, 1996.

HOPKINS, F. Note on a yellow pigment from butterflies. **Nature**, v. 40, n. 355, 1889.

HSIEH, H. L.; YANG, C. M. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 484613, 2013.

HUBER, C. *et al.* . Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. **J Exp Med**, v. 160, n. 1, p. 310-6, 1984.

HULL, M.; PASINETTI, G. M.; AISEN, P. S. Elevated plasma neopterin levels in Alzheimer disease. **Alzheimer Dis Assoc Disord**, v. 14, n. 4, p. 228-30, 2000.

HURD, Y. L.; SUZUKI, M.; SEDVALL, G. C. D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. **J Chem Neuroanat**, v. 22, n. 1-2, p. 127-37, 2001.

HYLAND, K.; HEALES, S. J. Tetrahydrobiopterin and quinonoid dihydrobiopterin concentrations in CSF from patients with dihydropteridine reductase deficiency. **J Inherit Metab Dis**, v. 16, n. 3, p. 608-10, 1993.

ISHII, M. *et al.* . Reduction of GTP cyclohydrolase I feedback regulating protein expression by hydrogen peroxide in vascular endothelial cells. **J Pharmacol Sci**, v. 97, n. 2, p. 299-302, 2005.

JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 9, p. 665-77, 2008.

KALINDERI, K. *et al.* . Pharmacological treatment and the prospect of pharmacogenetics in Parkinson's disease. **Int J Clin Pract**, v. 65, n. 12, p. 1289-94, 2011.

KANEKO, Y. S. *et al.* . Peripheral administration of lipopolysaccharide enhances the expression of guanosine triphosphate cyclohydrolase I mRNA in murine locus coeruleus. **Neuroscience**, v. 116, n. 1, p. 7-12, 2003.

KAUFMANN, W. [Water-Electrolyte Balance in Acute Abdominal Diseases]. **Med Welt**, v. 50, p. 2557-64, 1963.

KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v. 277, n. 5692, p. 93-6, 1979.

KERLER, F. *et al.* . Regulation of tetrahydrobiopterin synthesis during lectin stimulation of human peripheral blood lymphocytes. **FEBS Lett**, v. 250, n. 2, p. 622-4, 1989.

KHACHIGIAN, L. M. Collagen antibody-induced arthritis. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2512-6, 2006.

KHOROOSHI, R.; OWENS, T. Injury-induced type I IFN signaling regulates inflammatory responses in the central nervous system. **J Immunol**, v. 185, n. 2, p. 1258-64, 2010.

KLUGER, B. M.; KRUPP, L. B.; ENOKA, R. M. Fatigue and fatigability in neurologic illnesses: proposal for a unified taxonomy. **Neurology**, v. 80, n. 4, p. 409-16, 2013.

KOLLER, W. C. Treatment of early Parkinson's disease. **Neurology**, v. 58, n. 4 Suppl 1, p. S79-86, 2002.

KRAMER, C. D.; GENCO, C. A. Microbiota, Immune Subversion, and Chronic Inflammation. **Front Immunol**, v. 8, p. 255, 2017.

KUEHNE, L. K. *et al.* . Cerebrospinal fluid neopterin is brain-derived and not associated with blood-CSF barrier dysfunction in non-inflammatory affective and schizophrenic spectrum disorders. **J Psychiatr Res**, v. 47, n. 10, p. 1417-22, 2013.

KUPHAL, K. E.; FIBUCH, E. E.; TAYLOR, B. K. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. **J Pain**, v. 8, n. 12, p. 989-97, 2007.

KURTZ, P.; PALFAI, T. Effects of reserpine on retention of escape reversal in mice: absence of state-dependent learning. **J Comp Physiol Psychol**, v. 91, n. 2, p. 393-406, 1977.

KWON, M. *et al.* . The role of descending inhibitory pathways on chronic pain modulation and clinical implications. **Pain Pract**, v. 14, n. 7, p. 656-67, 2014.

LANG, A. E. When and how should treatment be started in Parkinson disease? **Neurology**, v. 72, n. 7 Suppl, p. S39-43, 2009.

LATINI, A. *et al.* . Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Mol Genet Metab**, v. 86, n. 1-2, p. 188-99, 2005.

LATINI, A. *et al.* . Biochemical Mechanisms of Neurodegeneration in Parkinson's Disease: Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress and Glutamatergic Excitotoxicity In: AGUIAR, A. S., JR. e PREDIGER, R.

D. (Ed.). **Frontiers in Parkinson's Disease Research**. New York, USA
Nova Science Publishers, v.1, 2012. ISBN 978-1-61324-230-8.

LATREMOLIERE, A.; COSTIGAN, M. GCH1, BH4 and pain. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, n. 10, p. 1728-41, 2011.

LATREMOLIERE, A. *et al.* . Reduction of Neuropathic and Inflammatory Pain through Inhibition of the Tetrahydrobiopterin Pathway. **Neuron Cell**, v. 86, p. 1-14, 2015.

LATREMOLIERE, A. *et al.* . Reduction of Neuropathic and Inflammatory Pain through Inhibition of the Tetrahydrobiopterin Pathway. **Neuron**, v. 86, n. 6, p. 1393-406, 2015.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, v. 10, n. 9, p. 895-926, 2009.

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**, v. 322, n. 7289, p. 763-7, 2001.

LAZZARINI, M. *et al.* . Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model. **Glia**, v. 61, n. 7, p. 1084-100, 2013.

LEE, K. I. *et al.* . The anti-hypertensive drug reserpine induces neuronal cell death through inhibition of autophagic flux. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 462, n. 4, p. 402-8, 2015.

LEE, Y.; LEE, C. H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Mol Cells**, v. 20, n. 3, p. 315-24, 2005.

LEVINE, R. A. *et al.* . Immunological evidence for the requirement of sepiapterin reductase for tetrahydrobiopterin biosynthesis in brain. **J Neurochem**, v. 54, n. 4, p. 1218-24, 1990.

LI, Y. *et al.* . Deficient Activity of the Nuclease MRE11A Induces T Cell Aging and Promotes Arthritogenic Effector Functions in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Immunity**, v. 45, n. 4, p. 903-916, 2016.

LINAZASORO, G. New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, n. 8, p. 391-7, 2005.

LINDSAY, A. *et al.* . Positional demands of professional rugby. **Eur J Sport Sci**, v. 15, n. 6, p. 480-7, 2015.

LINDSAY, A. *et al.* . Impact-induced muscle damage and urinary pterins in professional rugby: 7,8-dihydroneopterin oxidation by myoglobin. **Scand J Med Sci Sports**, v. 26, n. 3, p. 329-37, 2016.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473-7, 2008.

LONGO, N. Disorders of bipterin metabolism. **J Inherit Metab Dis**, v. 32, n. 3, p. 333-42, 2009.

LOTSCH, J. *et al.* . Reliable screening for a pain-protective haplotype in the GTP cyclohydrolase 1 gene (GCH1) through the use of 3 or fewer single nucleotide polymorphisms. **Clin Chem**, v. 53, n. 6, p. 1010-5, 2007.

LOU, J. S. Physical and mental fatigue in Parkinson's disease: epidemiology, pathophysiology and treatment. **Drugs Aging**, v. 26, n. 3, p. 195-208, 2009.

LOU, J. S. *et al.* . Levodopa normalizes exercise related cortico-motoneuron excitability abnormalities in Parkinson's disease. **Clin Neurophysiol**, v. 114, n. 5, p. 930-7, 2003a.

LOU, J. S. *et al.* . Levodopa improves physical fatigue in Parkinson's disease: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. **Mov Disord**, v. 18, n. 10, p. 1108-14, 2003b.

LOU, J. S. *et al.* . Exacerbated physical fatigue and mental fatigue in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 16, n. 2, p. 190-6, 2001.

LOWRY, O. H. *et al.* . Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LU, X. Y.; GHASEMZADEH, M. B.; KALIVAS, P. W. Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. **Neuroscience**, v. 82, n. 3, p. 767-80, 1998.

MAGGIOLI, E. *et al.* . Estrogen protects the blood-brain barrier from inflammation-induced disruption and increased lymphocyte trafficking. **Brain Behav Immun**, v. 51, p. 212-22, 2016.

MANSOUR, A. R. *et al.* . Chronic pain: the role of learning and brain plasticity. **Restor Neurol Neurosci**, v. 32, n. 1, p. 129-39, 2014.

MARSDEN, C. D. Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 57, n. 6, p. 672-81, 1994.

MARTIN, S. A. *et al.* . Voluntary wheel running does not affect lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in young adult and aged mice. **Neuroimmunomodulation**, v. 21, n. 1, p. 52-63, 2014.

MARTIN, S. A. *et al.* . Effects of voluntary wheel running on LPS-induced sickness behavior in aged mice. **Brain Behav Immun**, v. 29, p. 113-23, 2013.

MATSUMURA, K.; KOBAYASHI, S. Signaling the brain in inflammation: the role of endothelial cells. **Front Biosci**, v. 9, p. 2819-26, 2004.

MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 2, p. 120-9, 2000.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 278-94, 2006.

MAYER, B.; JOHN, M.; BOHME, E. Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. **FEBS Lett**, v. 277, n. 1-2, p. 215-9, 1990.

MCGEER, P. L. *et al.* . Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1285-91, 1988.

MEDZHITOV, R.; HORNG, T. Transcriptional control of the inflammatory response. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 10, p. 692-703, 2009.

MEEUSEN, R. *et al.* . Central fatigue: the serotonin hypothesis and beyond. **Sports Med**, v. 36, n. 10, p. 881-909, 2006.

METTA, V. *et al.* . The possible clinical predictors of fatigue in Parkinson's disease: a study of 135 patients as part of international nonmotor scale validation project. **Parkinsons Dis**, v. 2011, p. 125271, 2011.

MILES, L. Physical activity and health. **British Nutrition Foundation**, v. 32, p. 314-363, 2007.

MOLERO-LUIS, M. *et al.* . Cerebrospinal fluid neopterin analysis in neuropsychiatric patients: establishment of a new cut off-value for the identification of inflammatory-immune mediated processes. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e83237, 2013a.

MOLERO-LUIS, M. *et al.* . Homovanillic acid in cerebrospinal fluid of 1388 children with neurological disorders. **Dev Med Child Neurol**, v. 55, n. 6, p. 559-66, 2013b.

MORA, S. *et al.* . Association of physical activity and body mass index with novel and traditional cardiovascular biomarkers in women. **JAMA**, v. 295, n. 12, p. 1412-9, 2006.

MORTENSEN, O. V.; AMARA, S. G. Dynamic regulation of the dopamine transporter. **Eur J Pharmacol**, v. 479, n. 1-3, p. 159-70, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MRAKIC-SPOSTA, S. *et al.* . Effects of Mountain Ultra-Marathon Running on ROS Production and Oxidative Damage by Micro-Invasive Analytic Techniques. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0141780, 2015.

NAGATSU, T.; ICHINOSE, H. GTP cyclohydrolase I gene, tetrahydrobiopterin, and tyrosine hydroxylase gene: their relations to dystonia and parkinsonism. **Neurochem Res**, v. 21, n. 2, p. 245-50, 1996.

NANDAKUMAR, K. S.; HOLMDAHL, R. Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 8, n. 6, p. 223, 2006.

NAUDON, L. *et al.* . Reserpine affects differentially the density of the vesicular monoamine transporter and dihydrotetabenazine binding sites. **Eur J Neurosci**, v. 8, n. 4, p. 842-6, 1996.

NEDER, J. A.; NERY, L. E. **Fisiologia Clínica do Exercício**. Artes Médicas. São Paulo: 2003.

NELSON, M. E. *et al.* . Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Circulation**, v. 116, n. 9, p. 1094-105, 2007.

NESI, R. T. *et al.* . Physical exercise is effective in preventing cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response in mice. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 11, p. 603-10, 2016.

NEVILLE, B. G. *et al.* . Sepiapterin reductase deficiency: a congenital dopa-responsive motor and cognitive disorder. **Brain**, v. 128, n. Pt 10, p. 2291-6, 2005.

NGUYEN, A. T. *et al.* . Lipopolysaccharides-mediated increase in glucose-stimulated insulin secretion: involvement of the GLP-1 pathway. **Diabetes**, v. 63, n. 2, p. 471-82, 2014.

NOLLET, M.; LE GUIQUET, A. M.; BELZUNG, C. Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. **Curr Protoc Pharmacol**, v. Chapter 5, p. Unit 5 65, 2013.

O'DELL, J. R. *et al.* . Therapies for active rheumatoid arthritis after methotrexate failure. **N Engl J Med**, v. 369, n. 4, p. 307-18, 2013.

OLANOW, C. W.; STERN, M. B.; SETHI, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). **Neurology**, v. 72, n. 21 Suppl 4, p. S1-136, 2009.

ONUAGULUCHI, G. **Drug treatment of parkinsonism and its assessment.** *In Handbook of clinical neurology* North-Holland, Amsterdam. 6: 218-226 p. 1968.

OTA, A. *et al.* . Effect of peripherally administered lipopolysaccharide (LPS) on GTP cyclohydrolase I, tetrahydrobiopterin and norepinephrine in the locus coeruleus in mice. **Stress**, v. 10, n. 2, p. 131-6, 2007.

OZINSKY, A. *et al.* . The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 25, p. 13766-71, 2000.

PARK, K. W. *et al.* . Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo. **Exp Mol Med**, v. 39, n. 6, p. 812-9, 2007.

PARK, Y. S. *et al.* . Human carbonyl and aldose reductases: new catalytic functions in tetrahydrobiopterin biosynthesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 175, n. 3, p. 738-44, 1991.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. **Physiol Rev**, v. 94, n. 4, p. 1077-98, 2014.

PERREAULT, M. L. *et al.* . The dopamine d1-d2 receptor heteromer in striatal medium spiny neurons: evidence for a third distinct neuronal pathway in Basal Ganglia. **Front Neuroanat**, v. 5, p. 31, 2011.

PERREGAUX, D.; GABEL, C. A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. **J Biol Chem**, v. 269, n. 21, p. 15195-203, 1994.

PERUCCI, L. O. *et al.* . Resolution of inflammation pathways in preeclampsia-a narrative review. **Immunol Res**, 2017.

PESTA, D.; GNAIGER, E. High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle. **Methods Mol Biol**, v. 810, p. 25-58, 2012.

PETZINGER, G. M. *et al.* . Effects of treadmill exercise on dopaminergic transmission in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned mouse model of basal ganglia injury. **J Neurosci**, v. 27, n. 20, p. 5291-300, 2007.

PINHO, R. A. *et al.* . Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. **Cell Biol Int**, v. 30, n. 10, p. 848-53, 2006.

PINHO, R. A. *et al.* . Alterations in muscular oxidative metabolism parameters in incremental treadmill exercise test in untrained rats. **Eur J Appl Physiol**, v. 112, n. 1, p. 387-96, 2012.

POLAZZI, E.; CONTESTABILE, A. Reciprocal interactions between microglia and neurons: from survival to neuropathology. **Rev Neurosci**, v. 13, n. 3, p. 221-42, 2002.

POLTORAK, A. *et al.* . Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085-8, 1998.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 229, n. 2, p. 327-36, 1977.

PRINZ, M.; PRILLER, J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. **Nat Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 136-144, 2017.

RAITAKARI, O. T. *et al.* . Associations between physical activity and risk factors for coronary heart disease: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **Med Sci Sports Exerc**, v. 29, n. 8, p. 1055-61, 1997.

RANIERI, F.; DI LAZZARO, V. The role of motor neuron drive in muscle fatigue. **Neuromuscul Disord**, v. 22 Suppl 3, p. S157-61, 2012.

REMOR, A. P. *et al.* . Differential effects of insulin on peripheral diabetes-related changes in mitochondrial bioenergetics: involvement of advanced glycosylated end products. **Biochim Biophys Acta**, v. 1812, n. 11, p. 1460-71, 2011.

REYES, T. M.; COE, C. L. Interleukin-1 beta differentially affects interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the blood and central nervous system of the monkey. **J Neuroimmunol**, v. 66, n. 1-2, p. 135-41, 1996.

RODRIGUEZ, M. C.; OBESO, J. A.; OLANOW, C. W. Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. **Ann Neurol**, v. 44, n. 3 Suppl 1, p. S175-88, 1998.

ROELANDS, B.; MEEUSEN, R. Alterations in central fatigue by pharmacological manipulations of neurotransmitters in normal and high ambient temperature. **Sports Med**, v. 40, n. 3, p. 229-46, 2010.

SANTOS, J. R. *et al.* . Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behav Brain Res**, v. 253, p. 68-77, 2013.

SCHAPIRA, A. H. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 1, p. 97-109, 2008.

SCHAPIRA, A. H. *et al.* . Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Lancet**, v. 1, n. 8649, p. 1269, 1989.

SCHEFER, V.; TALAN, M. I. Oxygen consumption in adult and AGED C57BL/6J mice during acute treadmill exercise of different intensity. **Exp Gerontol**, v. 31, n. 3, p. 387-92, 1996.

SCHIFITTO, G. *et al.* . Fatigue in levodopa-naive subjects with Parkinson disease. **Neurology**, v. 71, n. 7, p. 481-5, 2008.

SCHOBERSBERGER, W. *et al.* . Neopterin and 7,8-dihydroneopterin induce apoptosis in the rat alveolar epithelial cell line L2. **FEBS Lett**, v. 397, n. 2-3, p. 263-8, 1996.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92-101, 2014.

SHIOZAKI, S. *et al.* . Actions of adenosine A2A receptor antagonist KW-6002 on drug-induced catalepsy and hypokinesia caused by reserpine or MPTP. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 147, n. 1, p. 90-5, 1999.

SHUKLA, V. H.; DAVE, K. R.; KATYARE, S. S. Effect of catecholamine depletion on oxidative energy metabolism in rat liver, brain and heart mitochondria; use of reserpine. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 127, n. 1, p. 79-90, 2000.

SHULMAN, L. M. *et al.* . Non-recognition of depression and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 8, n. 3, p. 193-7, 2002.

SIBLEY, D. R.; MONSMA, F. J., JR. Molecular biology of dopamine receptors. **Trends Pharmacol Sci**, v. 13, n. 2, p. 61-9, 1992.

SIGWALT, A. R. *et al.* . Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression. **Neuroscience**, v. 192, p. 661-74, 2011.

SILVA, L. A. *et al.* . Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 105, n. 6, p. 861-7, 2009.

SINGH, A.; KULKARNI, S. K. Nitecapone and selegiline as effective adjuncts to L-DOPA in reserpine-induced catatonia in mice. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 24, n. 1, p. 23-9, 2002.

SKIRBOLL, L. R.; GRACE, A. A.; BUNNEY, B. S. Dopamine auto- and postsynaptic receptors: electrophysiological evidence for differential sensitivity to dopamine agonists. **Science**, v. 206, n. 4414, p. 80-2, 1979.

SMITH, J. A. *et al.* . Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. **Brain Res Bull**, v. 87, n. 1, p. 10-20, 2012.

SOEHNLEIN, O. *et al.* . Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nat Rev Immunol**, v. 17, n. 4, p. 248-261, 2017.

SOMERS, D. L.; CLEMENTE, F. R. Contralateral high or a combination of high- and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation reduces mechanical allodynia and alters dorsal horn neurotransmitter content in neuropathic rats. **J Pain**, v. 10, n. 2, p. 221-9, 2009.

SOUZA, D. G. *et al.* . The essential role of the intestinal microbiota in facilitating acute inflammatory responses. **J Immunol**, v. 173, n. 6, p. 4137-46, 2004.

SPECK, A. E. *et al.* . The dose-dependent antioxidant effects of physical exercise in the hippocampus of mice. **Neurochem Res**, v. 39, n. 8, p. 1496-501, 2014.

SPILLANTINI, M. G. *et al.* . Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, n. 6645, p. 839-40, 1997.

SPRENGER, H. *et al.* . Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 63, n. 2, p. 188-95, 1992.

SPULBER, S. *et al.* . Molecular hydrogen reduces LPS-induced neuroinflammation and promotes recovery from sickness behaviour in mice. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e42078, 2012.

STAAL, R. G.; MOSHAROV, E. V.; SULZER, D. Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore. **Nat Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 341-6, 2004.

SU, A. *et al.* . A practical review of gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, 2017.

SUH, J. *et al.* . Progressive increase in central nervous system immune activation in untreated primary HIV-1 infection. **J Neuroinflammation**, v. 11, p. 199, 2014.

SUZUKI, A. *et al.* . Cause of death in 81 autopsied patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 21, n. 1, p. 33-6, 1994.

TADAIESKY, M. T.; ANDREATINI, R.; VITAL, M. A. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. **Eur J Pharmacol**, v. 535, n. 1-3, p. 199-207, 2006.

TAGUCHI, H.; ARMAREGO, W. L. Glycerol-ether monooxygenase [EC 1.14.16.5]. A microsomal enzyme of ether lipid metabolism. **Med Res Rev**, v. 18, n. 1, p. 43-89, 1998.

TAKAHASHI, K.; ROCHFORD, C. D.; NEUMANN, H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. **J Exp Med**, v. 201, n. 4, p. 647-57, 2005.

TAKAZAWA, C. *et al.* . A brain-specific decrease of the tyrosine hydroxylase protein in sepiapterin reductase-null mice--as a mouse model for Parkinson's disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 367, n. 4, p. 787-92, 2008.

TAKIKAWA, O. *et al.* . Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. **J Biol Chem**, v. 261, n. 8, p. 3648-53, 1986.

TANSEY, M. G.; MCCOY, M. K.; FRANK-CANNON, T. C. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. **Exp Neurol**, v. 208, n. 1, p. 1-25, 2007.

TAYLOR, P. *et al.* . Patient perceptions concerning pain management in the treatment of rheumatoid arthritis. **J Int Med Res**, v. 38, n. 4, p. 1213-24, 2010.

TEGEDER, I. *et al.* . GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. **Nat Med**, v. 12, n. 11, p. 1269-77, 2006.

THIERRY, A. M. *et al.* . Discovery of the mesocortical dopaminergic system: some pharmacological and functional characteristics. **Adv Biochem Psychopharmacol**, v. 16, p. 5-12, 1977.

THONY, B.; AUERBACH, G.; BLAU, N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. **Biochem J**, v. 347 Pt 1, p. 1-16, 2000.

THONY, B.; BLAU, N. Mutations in the BH₄-metabolizing genes GTP cyclohydrolase I, 6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase, sepiapterin reductase, carbinolamine-4a-dehydratase, and dihydropteridine reductase. **Hum Mutat**, v. 27, n. 9, p. 870-8, 2006.

TILZ, G. P. *et al.* . Increased immune activation during and after physical exercise. **Immunobiology**, v. 188, n. 1-2, p. 194-202, 1993.

TRONEL, C. *et al.* . Oxidative stress is related to the deleterious effects of heme oxygenase-1 in an in vivo neuroinflammatory rat model. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 264935, 2013.

TSANG, A. H.; CHUNG, K. K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 7, p. 643-50, 2009.

TUON, T. *et al.* . Physical Training Regulates Mitochondrial Parameters and Neuroinflammatory Mechanisms in an Experimental Model of Parkinson's Disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2015, p. 261809, 2015.

TWIG, G. *et al.* . Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. **EMBO J**, v. 27, n. 2, p. 433-46, 2008.

VASCONCELOS, A. R. *et al.* . Effects of intermittent fasting on age-related changes on Na,K-ATPase activity and oxidative status induced by lipopolysaccharide in rat hippocampus. **Neurobiol Aging**, v. 36, n. 5, p. 1914-23, 2015.

VOLLERTSEN, R. S. *et al.* . Rheumatoid vasculitis: survival and associated risk factors. **Medicine (Baltimore)**, v. 65, n. 6, p. 365-75, 1986.

VUCKOVIC, M. G. *et al.* . Exercise elevates dopamine D2 receptor in a mouse model of Parkinson's disease: in vivo imaging with [(1)(8)F]fallypride. **Mov Disord**, v. 25, n. 16, p. 2777-84, 2010.

WAKSELMAN, S. *et al.* . Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. **J Neurosci**, v. 28, n. 32, p. 8138-43, 2008.

WALSH, D. A.; MCWILLIAMS, D. F. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 10, n. 10, p. 581-92, 2014.

WANG, L. *et al.* . Metabolic inflammation exacerbates dopaminergic neuronal degeneration in response to acute MPTP challenge in type 2 diabetes mice. **Exp Neurol**, v. 251, p. 22-9, 2014.

WARBURTON, J. W. Depressive symptoms in Parkinson patients referred for thalamotomy. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 30, n. 4, p. 368-70, 1967.

WATSCHINGER, K. *et al.* . Glyceryl ether monooxygenase resembles aromatic amino acid hydroxylases in metal ion and tetrahydrobiopterin dependence. **Biol Chem**, v. 390, n. 1, p. 3-10, 2009.

WEINER, D. M. *et al.* . D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 5, p. 1859-63, 1991.

WEISS, G. *et al.* . Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. **FEBS Lett**, v. 321, n. 1, p. 89-92, 1993.

WERNER-FELMAYER, G. *et al.* . Induction of GTP cyclohydrolase I by bacterial lipopolysaccharide in the rat. **FEBS Lett**, v. 322, n. 3, p. 223-6, 1993a.

WERNER-FELMAYER, G. *et al.* . Modulation of nitric oxide synthase activity in intact cells by intracellular tetrahydrobiopterin levels. **Adv Exp Med Biol**, v. 338, p. 309-12, 1993b.

WERNER, E. R.; BLAU, N.; THONY, B. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. **Biochem J**, v. 438, n. 3, p. 397-414, 2011.

WERNER, E. R. *et al.* . Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T 24 cells. GTP-

cyclohydrolase I is stimulated by interferon-gamma, and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase are constitutively present. **J Biol Chem**, v. 265, n. 6, p. 3189-92, 1990.

WERNER, E. R.; WERNER-FELMAYER, G.; MAYER, B. Tetrahydrobiopterin, cytokines, and nitric oxide synthesis. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 219, n. 3, p. 171-82, 1998.

WESTACOTT, C. I. *et al.* . Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. **Ann Rheum Dis**, v. 49, n. 9, p. 676-81, 1990.

WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Aging of the Immune System. Mechanisms and Therapeutic Targets. **Ann Am Thorac Soc**, v. 13, n. Supplement_5, p. S422-S428, 2016.

WIDNER, B.; LEBLHUBER, F.; FUCHS, D. Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 109, n. 2, p. 181-9, 2002a.

_____. Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease. **J Neural Transm**, v. 109, n. 2, p. 181-9, 2002b.

WIJEMANNE, S.; JANKOVIC, J. Dopa-responsive dystonia--clinical and genetic heterogeneity. **Nat Rev Neurol**, v. 11, n. 7, p. 414-24, 2015.

WINWARD, C. *et al.* . Weekly exercise does not improve fatigue levels in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 27, n. 1, p. 143-6, 2012.

WIPFLI, B. *et al.* . An examination of serotonin and psychological variables in the relationship between exercise and mental health. **Scand J Med Sci Sports**, v. 21, n. 3, p. 474-81, 2011.

WISSMANN, P. *et al.* . Immune activation in patients with Alzheimer's disease is associated with high serum phenylalanine concentrations. **J Neurol Sci**, v. 329, n. 1-2, p. 29-33, 2013.

WOLFE, F.; MICHAUD, K. Assessment of pain in rheumatoid arthritis: minimal clinically significant difference, predictors, and the effect of

anti-tumor necrosis factor therapy. **J Rheumatol**, v. 34, n. 8, p. 1674-83, 2007.

WOOLF, C. J. Generation of acute pain: central mechanisms. **Br Med Bull**, v. 47, n. 3, p. 523-33, 1991.

_____. What is this thing called pain? **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3742-4, 2010.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, n. 5472, p. 1765-9, 2000.

WOOLF, C. J.; SHORTLAND, P.; COGGESHALL, R. E. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. **Nature**, v. 355, n. 6355, p. 75-8, 1992.

XIA, Y. *et al.* . Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. **J Biol Chem**, v. 273, n. 40, p. 25804-8, 1998.

XIONG, M. *et al.* . Post-ischemic hypothermia for 24h in P7 rats rescues hippocampal neuron: association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine expression. **Brain Res Bull**, v. 79, n. 6, p. 351-7, 2009.

YANG, D. *et al.* . Blocking lymphocyte trafficking with FTY720 prevents inflammation-sensitized hypoxic-ischemic brain injury in newborns. **J Neurosci**, v. 34, n. 49, p. 16467-81, 2014.

YOON, H. *et al.* . Moderate exercise training attenuates inflammatory mediators in DRG of Type 1 diabetic rats. **Exp Neurol**, v. 267, p. 107-14, 2015.

YOU, Q. *et al.* . Role of hepatic resident and infiltrating macrophages in liver repair after acute injury. **Biochem Pharmacol**, v. 86, n. 6, p. 836-43, 2013.

YOUDIM, M. B.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 4, p. 295-309, 2006.

ZHANG, J.; XU, C. Y.; LIU, J. Meta-analysis on the prevalence of REM sleep behavior disorder symptoms in Parkinson's disease. **BMC Neurol**, v. 17, n. 1, p. 23, 2017.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, v. 429, n. 1-3, p. 23-37, 2001.

ZIV, I. *et al.* . Enhanced fatigue during motor performance in patients with Parkinson's disease. **Neurology**, v. 51, n. 6, p. 1583-6, 1998.

ZORZI, G.; THONY, B.; BLAU, N. Reduced nitric oxide metabolites in CSF of patients with tetrahydrobiopterin deficiency. **J Neurochem**, v. 80, n. 2, p. 362-4, 2002.